

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 07-179356

(43)Date of publication of application : 18.07.1995

(51)Int.Cl.

A61K 38/00
A61K 38/00
// C12N 15/16
C12P 21/02
(C12P 21/02
C12R 1:91)

(21)Application number : 02-419158

(71)Applicant : NAKAMURA TOSHIICHI

(22)Date of filing : 28.12.1990

(72)Inventor : NAKAMURA TOSHIICHI
MATSUMOTO KUNIO

(54) EPITHELIOCYTE GROWTH PROMOTER

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain a medicine capable of selectively proliferating only an epitheliocyte.

CONSTITUTION: This epitheliocyte growth promoter comprises a hepatic parenchyma cell growth factor (HGF) as an active ingredient. HGF may be derived from a human or animal tissue or blood component or may be produced by gene recombination. In this case, a host cell of the gene recombination may be Escherichia coli, Bacillus subtilis, yeast, a filamentous fungus, a plant or an animal cell. The epitheliocyte growth promoter specifically promotes growth of only a normal epitheliocyte and has promoting action on cell motion. Consequently, the epitheliocyte growth promoter is suitable for use as various medicines, a growth agent for hair root cells and a cosmetic including wound treatment and skin ulcer treatment. Since the epitheliocyte growth promoter has neither multiplication activity of fibroblast nor canceration promotion activity of cell, it is utilized as a medicine having low adverse effect.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 29.12.1997

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3200609

[Date of registration] 22.06.2001

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-179356

(43) 公開日 平成7年(1995)7月18日

(51) Int. Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 38/00	ADT			
	ADA			
// C 1 2 N 15/16	ZNA			
		A 6 1 K 37/ 02	ADT	
			ADA	
審査請求 未請求 請求項の数4 書面 (全 13 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号 特願平2-419158

(22) 出願日 平成2年(1990)12月28日

(71) 出願人 591115073

中村 敏一

大阪府高槻市高見台10-27

(72) 発明者 中村 敏一

福岡市東区みどりヶ丘3丁目11-6

(72) 発明者 松本 邦夫

福岡市東区箱崎5丁目11-5 308号

(74) 代理人 弁理士 中島 敏

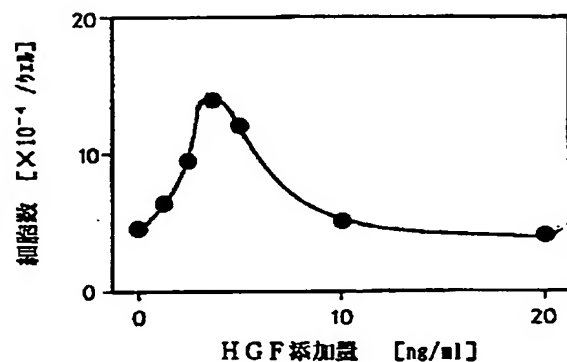
(54) 【発明の名称】 上皮細胞増殖促進剤

(57) 【要約】

(目的) 本発明は、上皮細胞のみを選択的に増殖促進させる薬剤を提供する。

(構成) 本発明は、肝実質細胞増殖因子HGFを有効成分とする上皮細胞増殖促進剤の発明である。本発明において、HGFはヒトまたは動物の組織ないし血液成分由来であってよく、またHGFは遺伝子組換えにより製造したものであってよい。この場合、遺伝子組換えの宿主細胞は大腸菌、枯草菌、酵母、糸状菌、植物または動物細胞のいずれかであってよい。

(効果) 本発明の上皮細胞増殖促進剤は、正常上皮細胞のみを特異的に増殖促進し、また、細胞運動性促進活性を有する。このため、創傷治療、皮膚潰瘍治療を始め、各種医薬品の用途や、毛根細胞の増殖剤、化粧品として用いることができる。繊維芽細胞の増殖や細胞のガン化促進活性を有しないので、副作用の少ない薬剤として活用できる。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】肝実質細胞増殖因子 HGF を有効成分とする上皮細胞増殖促進剤。

【請求項 2】HGF がヒトまたは動物の組織ないし血液成分由来である請求項第 1 項記載の上皮細胞増殖促進剤。

【請求項 3】HGF が遺伝子組換えにより製造したものである請求項第 1 項記載の上皮細胞増殖促進剤。

【請求項 4】遺伝子組換えの宿主細胞が大腸菌、枯草菌、酵母、糸状菌、植物または動物細胞のいずれかである請求項第 3 項記載の上皮細胞増殖促進剤。

【発明の詳細な説明】

（産業上の利用分野）本発明は肝実質細胞増殖因子を有効成分として含有してなる上皮細胞増殖促進剤に関する。

（従来の技術）皮膚は表皮、真皮、皮下組織の 3 層からなり、表皮はいわゆる上皮であり外胚葉に由来するのに対し、真皮、皮下組織は中胚葉（間葉）に由来する結合組織である。表皮は胚芽層（基底層）、有きょく層、顆粒層などからなる層状をなしている。表皮を形成する細胞はマルピギー系細胞またはケラチノサイトと呼ばれる一般表皮細胞と木の枝のような突起を持つメラノサイトに大別される。ケラチノサイトは角化能力をもち、メラノサイトはメラニン色素の産生能力を持つことで特徴づけられる。ケラチノサイトは表皮全体を形成する主要な細胞であるが、メラノサイトは表皮の胚芽層に主に存在する。表皮の最外部は角質層と呼ばれ、ケラチンを大量に含んだ、鱗片状の細胞の死骸の堆積物である。上皮細胞の更新は、最深部の胚芽層において新生したケラチノサイトが角質層の上端に達して脱落するという過程を経て約 15～30 日間で行われる。メラノサイトはメラニン色素を産生するが、色素量はメラノサイトの数に依存するのではなく、メラノサイトの色素産生能力と色素分配能力により決定される。例えば、黒人と白人などの人種間で、メラノサイトの分布密度に差異がなく、産生されたメラニン顆粒が 1 ヶ所に集まると皮膚の色は白く見え、小さい顆粒が広く分散すると黒く見える。表皮は形態的にも機能的にも 2 つの独立した細胞要素—ケラチノサイトとメラノサイトの共生組織とみなすことができる。上皮細胞の増殖因子としてはすでに EGF (Epidermal Growth Factor; 上皮細胞成長因子) と呼ばれる物質が実用化に向けて臨床効果

(Nanney, L. B; J Invest Dermatol, 95, 624-629, 1990) と大量生産（アース製薬、特開平 02-104293 号など）の両面について検討されつつある。EGF はアミノ酸 53 個からなる約 6 kDa の分子量を持つポリペプチドであり、上皮細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞の細胞増殖促進効果を有することが知られている。EGF は医療品として種々の効果が期待されており、例えば、創傷治療

剤、消化性潰瘍治療剤、抗ガン剤、人工皮膚などへの応用が考えられているが、実用化には至っていない。EGF の作用効果の特徴は上皮細胞と共に線維芽細胞をも増殖させる点であり、このため、結合組織にまでおよぶ外傷の治療には適しているが、表皮のみが損傷を受けている外傷や皮膚潰瘍には最適とはいえない。EGF はまた、ガン化誘導作用を持つので、実用化には慎重にならざるを得ない。また、EGF 同様創傷治療剤として開発されつつある FGF（線維芽細胞成長因子）も主に線維芽細胞の増殖を促進するものであって、このため上皮細胞のみを選択的に増殖することは不可能であった。EGF と構造的に近縁である TGF- α もまた上皮細胞の増殖を促進させる活性を有するが、その名前の由来（トランスフォーミング成長因子、すなわちガン化促進因子）のとおり細胞をガン化させる活性を併せ持つという重大な欠陥があるので、ヒトや動物への投与は難しいと考えられている。

（発明が解決しようとする課題）本発明は従来見いだされていなかった、正常上皮細胞のみを特異的に増殖促進し線維芽細胞増殖促進作用やガン化作用を持たない薬剤を提供することを目的とするものである。正常上皮細胞のみを選択的に増殖させることができると、結合組織にまで至らない表層の外傷や皮膚潰瘍に非常に有用である。例えば、寝たきり老人の増加で大きな問題となってきた「床ずれ」は、受診患者 6 万 5000 人を数え、潜在患者はその 10 倍にものぼると推定されている。これは上皮細胞の更新速度が老齢化により基礎的に低下しているために起こる症状であり、症状が悪化して皮下組織にまで損傷が広がる以前に、上皮細胞を新生させ更新能力を高めることができれば、有効な治療および予防が可能となる。結合組織に至る外傷を治療する場合であっても、患部表面をいち早く上皮組織で覆うことができれば、患部は保護され自律的な皮膚組織更新が速やかに行われると期待できる。むしろ外傷の修復の際、線維芽細胞の増殖が進展しすぎると上皮細胞の再生が不完全な状態、いわゆる班痕、が残ると考えられる。同様に、あらゆる外科的手術において、術後の皮膚縫合は感染防御などの意味から重要であるが、上皮組織が速やかに癒着し、かつ治療後の表皮に痕跡が少なくなれば、非常に有用であることは確実である。従って、上皮細胞のみを選択的に増殖させる薬剤は、単独使用しても、あるいは EGF のように線維芽細胞増殖を促進する物質とともに使用しても創傷治療に対して有効である。正常上皮細胞のみを選択的に増殖させる薬剤は、EGF について従来から考えられている各種の適用範囲、例えば角膜手術、抗消化性潰瘍、人工皮膚などについて、EGF よりむしろ特異性が高く効果を発揮すると期待される。さらにまた、上皮の更新を促すことから皮膚の新陳代謝を高め、肌を若々しく保つために有用であり化粧品としても広い用途が期待される。新しい用途として、育毛、術後の皮膚

3

回復、角膜化した皮膚の代謝促進、日焼け後やアトピー性皮膚炎などにおける表皮の回復などが期待される。とりわけ育毛については、血行促進などにより毛根細胞を活性化する薬剤が製品化されているが、正常上皮細胞のみを選択的に増殖させる薬剤によって毛根細胞を増殖促進すれば、より直接的に効果的である。

(課題を解決するための手段) 本発明は、肝実質細胞増殖因子HGFを有効成分とする上皮細胞増殖促進剤の発明である。本発明において、HGFはヒトまたは動物の組織ないし血液成分由来であってよく、またHGFは遺伝子組換えにより製造したものであってよい。この場合、遺伝子組換えの宿主細胞は大腸菌、枯草菌、酵母、糸状菌、植物または動物細胞のいずれかであってもよい。本発明の有効成分である肝実質細胞増殖因子(HGF)は本発明者らが再生肝ラット血清中から成熟肝実質細胞を*in vitro*で増殖させる因子として見いだした蛋白質である(Biochem Biophys Res Commun, 122, 1450, 1984)。本発明者らはさらに、HGFをラット血小板より単離することに成功し(FEBS Letter, 22, 311, 1987)、そのアミノ酸配列を決定した。さらに、本発明者らは、解明されたHGFアミノ酸配列をもとにヒトおよびラット由来のHGF cDNAクローニングを行い、このcDNAを動物組織に組換えて肝実質細胞増殖因子を蛋白質として得ることに成功した(ヒトHGF: Nature, 342, 440, 1989; ラットHGF: Proc. Natl. Acad. Sci, 87, 3200, 1990)。本発明者らは多年にわたり肝実質細胞の増殖因子を研究し、その結果上記のように、HGFを単離精製することに成功した。さらにその構造と活性を詳細に検討する中でHGFに上皮細胞、すなわちメラノサイトとケラチノサイトの増殖を特異的に促進する活性を見だし、本発明を完成するに至った。すなわち、HGFは以下の実施例に述べる如く、ヒト正常表皮ケラチノサイトおよびメラノサイトの増殖を5~10 ng/mlという低濃度で著しく促進するのみならず、両細胞の運動性を高める活性を有することが確認された。すなわち、創傷治癒など組織が再生されるときに重要なことは、組織を構成する細胞が増殖すると共に、増殖する細胞自身が損傷部位へ移動してゆくことであり、本発明の薬剤は完全に条件を満たしている。またHGFは元来、肝実質細胞増殖を促進する因子として発見されたポリペプチドであるが、上皮系細胞のみの増殖を促進し、間葉系細胞の増殖を促進せず、さらに細胞をガン化させる活性も持たないため、EGFと比べて非常に特異性が高く、より実用に適している。本発明に用いられるHGFは、*in vitro*で成熟ラット肝細胞を増殖させる因子として発見された生理活性ポリペプチドであり、分子量はSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動より82~85 kDである。ラットHGF分

4

子は440アミノ酸残基からなる α 鎖と233アミノ酸残基からなる β 鎖が1個のジスルフィド結合により架橋したヘテロダイマー構造を持ち、 α 、 β 両鎖とも2個のグルコサミン型糖鎖結合部位が存在する。ヒトHGFもまた同じ生理活性を有し、440アミノ酸残基からなる α 鎖と234アミノ酸残基からなる β 鎖とからなる。 α 鎖中には線溶酵素プラスミンと同様のクリングル構造が4個存在し、 β 鎖のアミノ酸配列においてもセリンプロテアーゼ活性を有するプラスミンのB鎖と約37%のホモロジーを有する。ヒトHGF前駆体のアミノ酸配列およびこれをコードする遺伝子の塩基配列を配列図1および2に示した。すなわち、ヒトHGFは、配列表2に示す728このアミノ酸からなる前駆体として生合成され、その後440アミノ酸残基(配列表2における第55位のProから第494位のArgまで)からなる α 鎖と、234アミノ酸残基(配列表2における第495位のValから第728位のSerまで)からなる β 鎖にわかれる。ラットHGFとヒトHGFのアミノ酸配列のホモロジーは α 鎖において91.6%、 β 鎖において88.9%と非常に高い相同性を持ち、その活性は全く互換性がある。本発明のHGFは種々の方法により得ることができる。例えば、ラット、ウシなどの哺乳動物の肝臓、脾臓、肺臓、骨髄、脳、腎臓、胎盤などの臓器および血小板、白血球などの血液細胞や血漿、血清などから抽出、精製して得ることができる。また、HGFを産生する初代培養細胞や株化細胞を培養し、培養物から分離精製してHGFを得ることもできる。あるいは公知の遺伝子工学的的手法(Nature, 342, 440, 1989)によりHGFをコードする遺伝子を大腸菌、枯草菌、酵母、糸状菌、植物または動物細胞等適切な宿主細胞に組み込み、この形質転換体の培養物から目的とする組換えHGFを得ることができる。こうして得られたHGFは、そのアミノ酸配列の一部が欠失、もしくは置換したり、他のアミノ酸配列が一部挿入されていたり、あるいは糖類が同様に欠失あるいは置換されていても、上皮細胞増殖の促進活性を有する限り本発明の範囲に含まれる。本発明の有効成分であるHGFは、ヒトを含むウシ、ウマ、ラット、ヒツジなどいずれの哺乳動物に由来するものであっても優れた上皮細胞増殖の促進効果を持ち、いずれの哺乳動物に対しても有効な上皮細胞増殖効果を有する。すなわち、本発明の上皮細胞増殖促進剤はヒトのみならず動物用医薬品とすることができる。本発明の上皮細胞増殖促進剤ならびに皮膚疾患治療剤は有効成分であるHGF単独で、あるいは他の上皮細胞増殖促進因子や既知の担体と共に外用薬または化粧品として製剤化するのが望ましい。また、本発明の治療剤および予防剤はHGF以外に製剤化に必要な添加物、例えば安定化剤、賦形剤、溶解補助剤、酸化防止剤等を含んでも良い。製剤化する場合はその用途に応じて軟膏状、ゲル状、液状など種々の剤形にして用いることができる。ま

た、凍結乾燥により担体と共に固形化して保存し、必要に応じて液状とすることも可能である。

(作用効果) 本発明の上皮細胞増殖促進剤は、正常上皮細胞のみを特異的に増殖促進し、また、細胞運動性促進活性を有する。このため、創傷治療、皮膚潰瘍治療を始め、消化性潰瘍治療、抗ガン、手術後の皮膚縫合、角膜手術などにおける医薬品の用途や、毛根細胞の増殖剤、さらに皮膚の新陳代謝を高める化粧品として用いることができる。また、HGFは、EGF、TGF- α 、FGFとは異なり、繊維芽細胞の増殖や細胞のガン化促進活性を有しない。このため、従来になく特異性の高い、また副作用の少ない薬剤として活用することができる。

(実施例) 以下に本発明の実施態様及び効果を明らかにするための実施例を挙げ本発明を更に詳細に説明するが、もとより本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

実施例1

ラット肝臓から本発明の肝実質細胞増殖因子HGFは次のようにして製造した。Wister系のラットに体重の0.2%に相当する四塩化炭素を腹腔投与し、投与後約30時間目で肝臓を摘出した。肝臓をワークリングブレンダーで粉碎した後、日立20PR-52型冷却遠心器を用いて10,000rpm20分間遠心し、上清を得た。上清を0.15M NaCl+10mMヘプス+2mM CaCl_2 +0.01%ツイン80溶液を加えた50mMトリス塩酸緩衝液(pH8.5)で4℃一昼夜透析した。透析内液を透析液で平衡化したS-セファロース(FF)(ファルマシア社製)カラムに注入し、洗浄後、NaClの濃度勾配により溶出した。肝実質細胞増殖因子はNaCl濃度0.7M付近に溶出した。次にこのHGFをブルートリスアクリルM(IBF社製)クロマトグラフィーで精製した。溶出はアルギニンの濃度勾配により行い、HGFはアルギニン濃度0.25M付近で溶出した。得られた画分を次にヘパリン-セファロース(ファルマシア社)クロマトグラフィーにより精製した。溶出はNaClの濃度勾配により行い、HGFは1M前後のNaCl濃度付近で溶出した。次にフェニル5PW(東ソー社製)クロマトグラフィーにより精製した。溶出はNaCl濃度減少およびエチレングリコール濃度上昇勾配により行った。ラット100匹の肝臓当たり10 μ gのHGFが得られた。HGFの比活性は約50万単位/mgであった。得られたHGFに0.25%BSA(ウシ血清アルブミン)を加え、PBS(リン酸緩衝食塩水)にて透析した。

実施例2

遺伝子組換え法によりヒト細胞由来の肝実質細胞増殖因子HGFを製造した。Wiglerの方法(Cell, 11, 223, 1977)に記載された方法に従って、ヒト肝実質細胞増殖因子のアミノ酸配列をコードする遺

伝子により形質転換されたマウスC127細胞を培養し、その培養液上清より、ヒト肝実質細胞増殖因子を得た。すなわち、ヒト肝臓のmRNAから作られたcDNAライブラリーをスクリーニングし、ヒト肝実質細胞増殖因子のアミノ酸配列をコードするクローンHAC19とHBC25を得た。HAC19からのDNAをBamHIとScaIで、HBC25からのDNAをScaIとPstIで消化し、それぞれ得られた2つのDNAフラグメントをブルースクリプトKSIのBamHIとPstI部位に連結し挿入し、pBS[hHGFII]を得た。pBS[hHGFII]をXbaIとSalIとNaeIで消化し、更にT4DNAポリメラーゼで平滑末端とした後、ヒト肝実質細胞増殖因子をコードする約3KbのDNAフラグメントを、ウシバビローウイルスDNAをベクターとする発現ベクターpBPMTのEcoRV部位に挿入し、pBPMT[hHGFII]を得た。得られた肝実質細胞増殖因子発現ベクターpBPMT[hHGFII]を用いて、リン酸カルシウム法によりマウスC127細胞を形質転換した。形質転換体の選択は、G418を含む培地で増殖させることにより行った。得られた形質転換体の中から、高い肝実質細胞増殖因子産生能を示す細胞株BPH89を選び出した。BPH89細胞を牛胎児血清を加えた培地で増殖させた後、培地を2日おきに交換して、肝実質細胞増殖因子HGFを実施例1の精製法に準じた方法により精製した。

実施例3 ヒト正常表皮メラノサイトの増殖に対する効果

本発明の上皮細胞増殖促進剤の有効成分であるHGFの、メラノサイトに対する増殖促進作用を以下の方法により確認した。MCDB153(高アミノ酸タイプ)培地にインスリン5 μ g/ml、ヒドロコチゾン0.5 μ g/ml、フォルボール12-ミリスレート13-アセテート(PMA)10ng/mlを加えた無血清基礎培地を用いてヒト正常表皮メラノサイト(クラボウ株式会社)を懸濁し、12穴プラスチックプレートに10⁴個/ウェルになるように蒔いた。10%CO₂、25%O₂、65%N₂の条件下37℃で培養した。24時間培養後、無血清基礎培地にHGFを0から20ng/mlの範囲で段階的に加えた試験培地に交換し、培養を続けた。培養開始9日後に再びHGFを加えた試験培地を用いて培地交換をした後、15日後培養を終了し、最終細胞数をヘモサイトメーターにてカウントした。その結果、第1図に示す如く正常メラノサイトはHGFにより0~10ng/mlの範囲で用量依存的に増殖を促進され、最適濃度において約5倍にまで高められることが確認された。

実施例4 ヒト正常表皮メラノサイトの複製DNA合成に対する効果

実施例3に記載された無血清基礎培地にヒト正常表皮メラノサイトを懸濁し、24穴プラスチックプレートに4

$\times 10^4$ 個/ウェルになるように蒔いた。10% CO_2 、25% O_2 、65% N_2 の条件下37℃で培養した。24時間培養後、無血清基礎培地にHGFを0から20 ng/mlの範囲で段階的に加えた試験培地に交換し、培養を続けた。24時間培養後、0.5 μCi の [^{125}I] デオキシウリジンを各ウェルに添加した。さらに4時間培養して細胞に [^{125}I] を取り込ませた後、細胞をpH7.4のPBS（リン酸食塩緩衝液）にて洗浄し、冷10%トリクロロ酢酸水溶液で固定した。細胞を1N水酸化ナトリウム水溶液で可溶化し、その放射能をガンマカウンターにより測定した。また放射能測定後の試料の一部をとってMicro BCA Protein Assay System（ピアース社）により蛋白質量を測定した。細胞内に取り込まれた標識デオキシウリジンの量をコントロールとのカウント差として求め、これをヒト正常表皮メラノサイト蛋白質1 mgあたりに換算してDNA合成活性（dpm/mg蛋白質）とした。その結果、第2図に示す如く正常メラノサイトHGFにより0~10 ng/mlの範囲で用量依存的に複製DNA合成を促進され、最適濃度において約4

実施例5 ヒト正常表皮ケラチノサイトの増殖に対する効果

本発明の上皮細胞増殖促進剤の有効成分であるHGFの、ケラチノサイトに対する増殖促進作用を以下の方法により確認した。実施例1に記載された無血清基礎培地にウシ視床下部抽出物150 μg 蛋白質/mlを加えた培地にヒト正常表皮ケラチノサイトを懸濁し、12穴プラスチックプレートに 10^4 個/ウェルになるように蒔いた。10% CO_2 、25% O_2 、65% N_2 の条件下37℃で培養した。24時間培養後、カルシウムイオン濃度を1.8 mMに調整した無血清基礎培地に交換し、さらに24時間培養後HGFを0から20 ng/mlの範囲で段階的に添加し、培養を続けた。培養開始6日後、培地をHGFを加えた新しい培地に交換して培養を続け、4日後（培養開始から10日後）培養を終了し、最終細胞数をヘモサイトメーターにてカウントした。その結果、第3図に示す如く正常ケラチノサイトはHGFにより0~2.5 ng/mlの範囲で用量依存的に増殖を促進され、最適濃度において約3倍にまで高められることが確認された。

実施例6 ヒト正常表皮ケラチノサイトの複製DNA合成に対する効果

実施例3に記載された無血清基礎培地にウシ視床下部抽出物150 μg 蛋白質/mlを加えた培地にヒト正常表皮ケラチノサイトを懸濁し、24穴プラスチックプレートに 4×10^4 個/ウェルになるように蒔いた。10% CO_2 、25% O_2 、65% N_2 の条件下37℃で培養した。24時間培養後、カルシウムイオン濃度を1.8 mMに調整した無血清基礎培地に交換し、さらに24時

間培養後HGFを0から20 ng/mlの範囲で段階的に添加し、培養を続けた。24時間培養後、0.5 μCi の [^{125}I] デオキシウリジンを各ウェルに添加した。さらに4時間培養して細胞に [^{125}I] を取り込ませた後、細胞をpH7.4のPBS（リン酸食塩緩衝液）にて2回洗浄し、冷10%トリクロロ酢酸水溶液で固定した。細胞を1N水酸化ナトリウム水溶液で可溶化し、その放射能をガンマカウンターにより測定した。また放射能測定後の試料の一部をとってMicro BCA Protein Assay System（ピアース社）により蛋白質量を測定した。細胞内に取り込まれた標識デオキシウリジンの量をコントロールとのカウント差として求め、これをヒト正常表皮メラノサイト蛋白質1 mgあたりに換算してDNA合成活性（dpm/mg蛋白質）とした。その結果、第4図に示す如く正常メラノサイトHGFにより0~5 ng/mlの範囲で用量依存的に複製DNA合成を促進され、最適濃度において約2倍にまで高められることが確認された。

実施例7 ヒト正常表皮ケラチノサイトの増殖に対する効果

実施例3に記載された無血清基礎培地にウシ視床下部抽出物150 μg 蛋白質/mlを加えた培地にヒト正常表皮ケラチノサイトを懸濁し、12穴プラスチックプレートに 2×10^4 個/ウェルになるように蒔いた。10% CO_2 、25% O_2 、65% N_2 の条件下37℃で培養した。2日間培養後、カルシウムイオン濃度を1.8 mMに調整した無血清基礎培地に交換し、さらに2日間培養後HGFを2.5 ng/ml添加し、培養を続けた。24時間培養後（培養開始から5日後）、細胞の増殖程度を顕微鏡下で観察した。その結果、第5図に示す如く、HGF添加培養液で培養した正常ケラチノサイトは無添加の場合に比して明らかに増殖が促進されていた。

実施例8 ヒト正常表皮ケラチノサイトの細胞運動性に対する効果

本発明の上皮細胞増殖促進剤の有効成分であるHGFの、ケラチノサイトの細胞運動性に対する促進作用を以下の方法により確認した。実施例3に記載された無血清基礎培地にウシ視床下部抽出物150 ng蛋白質/mlを加えた培地にヒト正常表皮ケラチノサイトを懸濁し、12穴プラスチックプレートに 2×10^4 個/ウェルになるように蒔いた。10% CO_2 、25% O_2 、65% N_2 の条件下37℃で培養した。2日間培養後、ウシ視床下部抽出物を添加しない無血清基礎培地に交換し、さらに24時間培養後HGFを0から10 ng/mlの範囲で段階的に添加し、培養を続けた。24時間後（培養開始から4日後）培養を終了し、細胞の状態を顕微鏡下で観察した。その結果、第6図に示す如く、HGF添加培養液で培養したヒト正常表皮ケラチノサイトは無添加のものに比べて細胞同士の接着が弱まり、細胞の運動性が高まっていることが確認された。

実験例 ヒト正常表皮ケラチノサイトの細胞運動性に対するEGF、TGF- α の効果

本発明の上皮細胞増殖促進剤の有効成分であるHGFと同様に上皮の細胞を増殖するEGF、TGF- α のケラチノサイトの細胞運動性に対する促進作用を、実施例8と同様の方法により確認した。実施例3に記載された無血清基礎培地にウシ視床下部抽出物150 μ g蛋白/mlを加えた培地にヒト正常表皮ケラチノサイトを懸濁し、12穴プラスチックプレートに 2×10^4 個/ウェルになるように蒔いた。10%CO₂、25%O₂、65%N₂の条件下37℃で培養した。2日間培養後、ウシ視床下部抽出物を添加しない無血清基礎培地に交換し、さらに24時間培養後EGFまたはTGF- α を10ng/mlの濃度で添加し、培養を続けた。24時間後(培養開始から4日後)培養を終了し、細胞の状態を顕微鏡下で観察した。その結果、第7図に示す如く、EGF、TGF- α 添加培養液で培養したヒト正常表皮ケラチノサイトは第6図のHGF添加培養の場合に比べて細胞同士の接着に変化がなく、細胞の運動性を促進する効果が無いことが確認された。

【図面の簡単な説明】

【図1】ヒト正常表皮メラノサイトの増殖に対するHGFの促進効果を示す図。●は各HGF濃度における培養終了時の細胞数(実施例3)。

【図2】ヒト正常表皮メラノサイトの増殖に対するHGFの促進効果を示す図。●は各HGF濃度における培養終了時の蛋白質量当たりのDNA合成量(実施例4)。

【図3】ヒト正常表皮ケラチノサイトの増殖に対するHGFの促進効果を示す図。●は各HGF濃度における培養終了時の細胞数(実施例5)。

【図4】ヒト正常表皮ケラチノサイトの増殖に対するHGFの促進効果を示す図。●は各HGF濃度における培養終了時の蛋白質量当たりのDNA合成量(実施例6)。

【図5】ヒト正常表皮ケラチノサイトの増殖に対するHGFの促進効果を示す顕微鏡観察写真。(a)はHGF無添加培養、(b)はHGF2.5ng/ml添加培養(実施例7)。

【図6】ヒト正常表皮ケラチノサイトの運動性に対するHGFの促進効果を示す顕微鏡観察写真。(a)はHGF無添加培養、(b)はHGF1ng/ml添加培養、(c)はHGF10ng/ml添加培養(実施例8)。

【図7】ヒト正常表皮ケラチノサイトの運動性に対するEGF、TGF- α の促進効果を示す顕微鏡観察写真。(a)はEGF、(b)はTGF- α をそれぞれ10ng/ml添加培養したもの(実験例)。

【配列表】

配列番号: 1

配列の長さ: 2184

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: Genomic DNA

ATGTGGGTGA CCAAACCTCT GCCAGCCCTG CTGCTGCAGC ATGTCCTCCT GCATCTCCTC 60
CTGCTCCCA TCGCCATCCC CTATGCAGAG GGACAAAGGA AAAGAAGAAA TACAATTCAT 120
GAATTCAAAA AATCAGCAAA GACTACCCTA ATCAAAATAG ATCCAGCACT GAAGATAAAA 180
ACCAAAAAAG TGAATACTGC AGACCAATGT GCTAATAGAT GTACTAGGAA TAAAGGACTT 240
CCATTCACIT GCAAGGCTTT TGTTTTGAT AAAGCAAGAA AACAATGCCT CTGGTTCCCC 300
TTCAATAGCA TGTCAGTGG AGTGAAAAA GAATTTGGCC ATGAATTTGA CCTCTATGAA 360
AACAAAGACT ACATTAGAAA CTGCATCATT GGTAAAGGAC GCAGCTACAA GGGAACAGTA 420
TCTATCACTA AGAGTGGCAT CAAATGTCAG CCCTGGAGTT CCATGATACC ACACGAACAC 480
AGCTTTTTGC CTTGAGCTA TCGGGGTAAA GACCTACAGG AAAACTACTG TCGAAATCCT 540
CGAGGGGAAG AAGGGGGACC CTGGTGTTC ACAAGCAATC CAGAGGTACG CTACGAAGTC 600
TGTGACATTC CTCAGTGTTC AGAAGTTGAA TGCATGACCT GCAATGGGGA GAGTTATCGA 660
GGTCTCATGG ATCATACTGA ATCAGGCAAG ATTTGTCAGC GCTGGGATCA TCAGACACCA 720
CACCGGCACA AATTCITGCC TGAAGATAT CCCGACAAGG GCTTTGATGA TAATTATTGC 780
CGCAATCCCG ATGGCCAGCC GAGGCCATGG TGCTATACTC TTGACCCTCA CACCCGCTGG 840
GAGTACTGTG CAATTA AAC ATGCGCTGAC AATACTATGA ATGACACTGA TGTTCCTTTG 900
GAAACAACCTG AATGCATCCA AGGTCAAGGA GAAGGCTACA GGGGCACTGT CAATACCAAT 960
TGGAAATGGA TTCCATGTCA GCGTTGGGAT TCTCAGTATC CTCACGAGCA TGACATGACT 1020
CCTGAAATTT TCAAGTGCAA GGACCTACGA GAAAATTACT GCGAAATCC AGATGGGTCT 1080
GAATCACCTT GGTGTTTTAC CACTGATCCA AACATCCGAG TTGGCTACTG CTCCCAATT 1140
CCAAACTGTG ATATGTCACA TGGACAAGAT TGTATCGTG GGAATGGCAA AAATTATATG 1200
GGCAACTTAT CCCAAACAAG ATCTGGACTA ACATGTTCAA TGTGGGACAA GAACATGGAA 1260

GACTTACATC GTCATATCTT CTGGGAACCA GATGCAAGTA AGCTGAATGA GAATTACTGC 1320
CGAAATCCAG ATGATGATGC TCATGGACCC TGGTGCTACA CGGGAAATCC ACTCATTCTT 1380
TGGGATTATT GCCCTATTTT TCGTTGTGAA GGTGATACCA CACCTACAAT AGTCAATTTA 1440
GACCATCCCG TAATATCTTG TGCCAAAACG AAACAATTGC GAGTTGTAAA TGGGATTCCA 1500
ACACGAACAA ACATAGGATG GATGTTAGT TTGAGATACA GAAATAAACA TATCTGCGGA 1560
GGATCATTGA TAAAGGAGAG TTGGGTTCTT ACTGCACGAC AGTGTTCCTT TTCTCGAGAC 1620
TTGAAGGATT ATGAAGCTTG GCTTGAATT CATGATGTCC ACGGAAGAGG AGATGAGAAA 1680
TGCAACAGG TTCTCAATGT TCCCAGCTG GTATATGCC CTGAAGGATC AGATCTGGTT 1740
TTAATGAAGC TTGCCAGGCC TGCTGCTCTG GATGATTTTG TTAGTACGAT TGATTTACCT 1800
AATTATGGAT GCACAATTCC TGAAAAGACC AGTTGAGTG TTTATGGCTG GGGCTACACT 1860
GGATTGATCA ACTATGATGG CCTATTACGA GTGGCACATC TCTATATAAT GGGAAATGAG 1920
AAATGCAGCC AGCATCATCG AGGGGAAGTG ACTCTGAATG AGTCTGAAAT ATGTGCTGGG 1980
GCTGAAAAGA TTGGATCAGG ACCATGTGAG GGGGATTATG GTGGCCCACT TGTGTTGAG 2040
CAACATAAAA TGAGAATGGT TCTTGGTETC ATTTGTCCTG GTCTGGATG TGCCATTCCA 2100
AATCGTCTG GTATTTTTGT CCGAGTAGCA TATTATGCAA AATGGATACA CAAATTATT 2160
TTAACATATA AGGTACCACA GTCA 2184

配列番号: 2

配列の長さ: 728

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 蛋白質

配列

Met	Trp	Val	Thr	Lys	Leu	Leu	Pro	Ala	Leu	Leu	Leu	Gln	His	Val
1				5					10					15
Leu	Leu	His	Leu	Leu	Leu	Leu	Pro	Ile	Ala	Ile	Pro	Tyr	Ala	Glu
				20					25					30
Gly	Gln	Arg	Lys	Arg	Arg	Asn	Thr	Ile	His	Glu	Phe	Lys	Lys	Ser
				35					40					45
Ala	Lys	Thr	Thr	Leu	Ile	Lys	Ile	Asp	Pro	Ala	Leu	Lys	Ile	Lys
				50					55					60
Thr	Lys	Lys	Val	Asn	Thr	Ala	Asp	Gln	Cys	Ala	Asn	Arg	Cys	Thr
				65					70					75
Arg	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Phe	Thr	Cys	Lys	Ala	Phe	Val	Phe	Asp
				80					85					90
Lys	Ala	Arg	Lys	Gln	Cys	Leu	Trp	Phe	Pro	Phe	Asn	Ser	Met	Ser
				95					100					105
Ser	Gly	Val	Lys	Lys	Glu	Phe	Gly	His	Glu	Phe	Asp	Leu	Tyr	Glu
				110					115					120
Asn	Lys	Asp	Tyr	Ile	Arg	Asn	Cys	Ile	Ile	Gly	Lys	Gly	Arg	Ser
				125					130					135
Tyr	Lys	Gly	Thr	Val	Ser	Ile	Thr	Lys	Ser	Gly	Ile	Lys	Cys	Gln
				140					145					150
Pro	Trp	Ser	Ser	Met	Ile	Pro	His	Glu	His	Ser	Phe	Leu	Pro	Ser
				155					160					165

15		16
Ser Tyr Arg Gly Lys Asp Leu Gln Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro		
170	175	180
Arg Gly Glu Glu Gly Gly Pro Trp Cys Phe Thr Ser Asn Arg Glu		
185	190	195
Val Arg Tyr Glu Val Cys Asp Ile Pro Gln Cys Ser Glu Val Glu		
200	205	210
Cys Met Thr Cys Asn Gly Glu Ser Tyr Arg Gly Leu Met Asp His		
215	220	225
Thr Glu Ser Gly Lys Ile Cys Gln Arg Trp Asp His Gln Thr Pro		
230	235	240
His Arg His Lys Phe Leu Pro Glu Arg Tyr Pro Asp Lys Gly Phe		
245	250	255
Asp Asp Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Gln Pro Arg Pro Trp		
260	265	270
Cys Tyr Thr Leu Asp Pro His Thr Arg Trp Glu Tyr Cys Ala Ile		
275	280	285
Lys Thr Cys Ala Asp Asn Thr Met Asn Asp Thr Asp Val Pro Leu		
290	295	300
Glu Thr Thr Glu Cys Ile Gln Gly Gln Gly Glu Gly Tyr Arg Gly		
305	310	315
Thr Val Asn Thr Ile Trp Asn Gly Ile Pro Cys Gln Arg Trp Asp		
320	325	330
Ser Gln Tyr Pro His Glu His Asp Met Thr Pro Glu Asn Phe Lys		
335	340	345
Cys Lys Asp Leu Arg Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Ser		
350	355	360
Glu Ser Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Asn Ile Arg Val Gly		
365	370	375

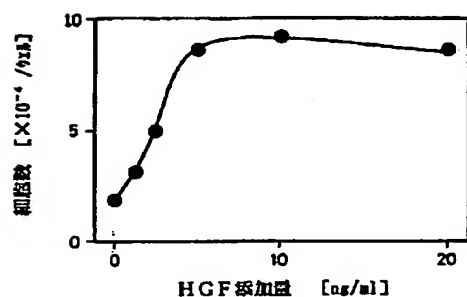
17

18

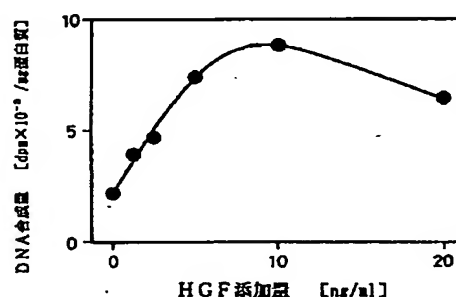
Tyr Cys Ser Gln Ile Pro Asn Cys Asp Met Ser His Gly Gln Asp		
380	385	390
Cys Tyr Arg Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Met Gly Asn Leu Ser Gln		
395	400	405
Thr Arg Ser Gly Leu Thr Cys Ser Met Trp Asp Lys Asn Met Glu		
410	415	420
Asp Leu His Arg His Ile Phe Trp Glu Pro Asp Ala Ser Lys Leu		
425	430	435
Asn Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asp Ala His Gly Pro		
440	445	450
Trp Cys Tyr Thr Gly Asn Pro Leu Ile Pro Trp Asp Tyr Cys Pro		
455	460	465
Ile Ser Arg Cys Glu Gly Asp Thr Thr Pro Thr Ile Val Asn Leu		
470	475	480
Asp His Pro Val Ile Ser Cys Ala Lys Thr Lys Gln Leu Arg Val		
485	490	495
Val Asn Gly Ile Pro Thr Arg Thr Asn Ile Gly Trp Met Val Ser		
500	505	510
Leu Arg Tyr Arg Asn Lys His Ile Cys Gly Gly Ser Leu Ile Lys		
515	520	525
Glu Ser Trp Val Leu Thr Ala Arg Gln Cys Phe Pro Ser Arg Asp		
530	535	540
Leu Lys Asp Tyr Glu Ala Trp Leu Gly Ile His Asp Val His Gly		
545	550	555
Arg Gly Asp Glu Lys Cys Lys Gln Val Leu Asn Val Ser Gln Leu		
560	565	570
Val Tyr Gly Pro Glu Gly Ser Asp Leu Val Leu Met Lys Leu Ala		
575	580	585

19	Arg	Pro	Ala	Val	Leu	Asp	Asp	Phe	Val	Ser	Thr	Ile	Asp	Leu	Pro	20
					590					595					600	
	Asn	Tyr	Gly	Cys	Thr	Ile	Pro	Glu	Lys	Thr	Ser	Cys	Ser	Val	Tyr	
					605					610					615	
	Gly	Trp	Gly	Tyr	Thr	Gly	Leu	Ile	Asn	Tyr	Asp	Gly	Leu	Leu	Arg	
					620					625					630	
	Val	Ala	His	Leu	Tyr	Ile	Met	Gly	Asn	Glu	Lys	Cys	Ser	Gln	His	
					635					640					645	
	His	Arg	Gly	Lys	Val	Thr	Leu	Asn	Glu	Ser	Glu	Ile	Cys	Ala	Gly	
					650					655					660	
	Ala	Glu	Lys	Ile	Gly	Ser	Gly	Pro	Cys	Glu	Gly	Asp	Tyr	Gly	Gly	
					665					670					675	
	Pro	Leu	Val	Cys	Glu	Gln	His	Lys	Met	Arg	Met	Val	Leu	Gly	Val	
					680					685					690	
	Ile	Val	Pro	Gly	Arg	Gly	Cys	Ala	Ile	Pro	Asn	Arg	Pro	Gly	Ile	
					695					700					705	
	Phe	Val	Arg	Val	Ala	Tyr	Tyr	Ala	Lys	Trp	Ile	His	Lys	Ile	Ile	
					710					715					720	
	Leu	Thr	Tyr	Lys	Val	Pro	Gln	Ser								
																728

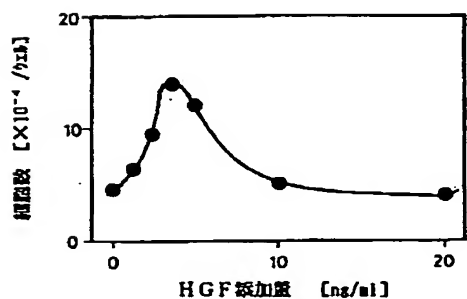
【第1図】



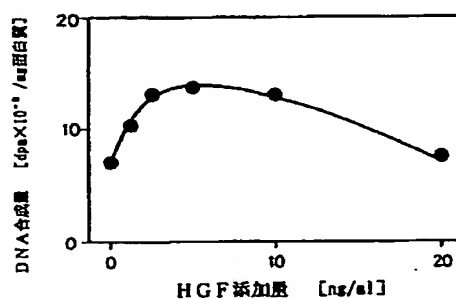
【第2図】



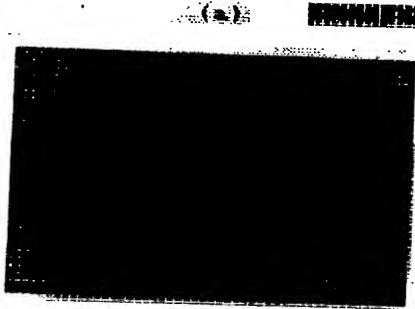
【第3図】



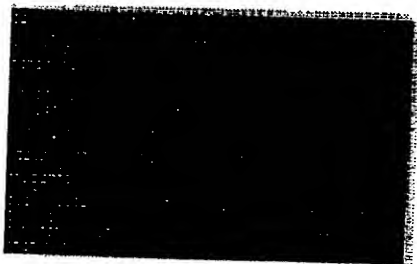
【第4図】



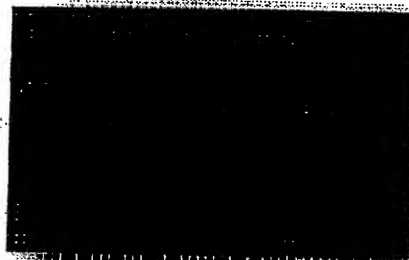
【第7図】



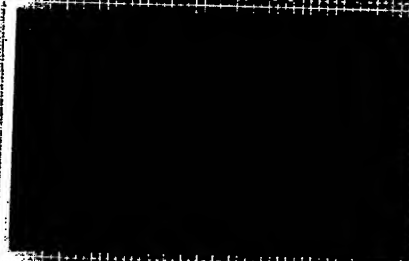
【第5図】



【第6図】



(a)



(b)



(c)

BEST AVAILABLE COPY

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁶

C 1 2 P 21/02

(C 1 2 P 21/02

C 1 2 R 1:91)

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

H 9282-4B

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載
 【部門区分】第3部門第2区分
 【発行日】平成11年(1999)5月25日

【公開番号】特開平 7-179356
 【公開日】平成7年(1995)7月18日
 【年通号数】公開特許公報 7-1794
 【出願番号】特願平 2-419158
 【国際特許分類第6版】

A61K 38/00 ADT
 ADA
 // C12N 15/16 ZNA
 C12P 21/02
 (C12P 21/02
 C12R 1:91)
 【F I】
 A61K 37/02 ADT
 C12P 21/02 H
 A61K 37/02 ADA

【手続補正書】

【提出日】平成4年3月13日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】発明の詳細な説明

【補正方法】変更

【補正内容】

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は肝実質細胞増殖因子を有効成分として含有してなる上皮細胞増殖促進剤に関する。

【0002】

【従来の技術】皮膚は表皮、真皮、皮下組織の3層からなり、表皮はいわゆる上皮であり外胚葉に由来するのに対し、真皮、皮下組織は中胚葉(間葉)に由来する結合組織である。表皮は胚芽層(基底層)、有きょく層、顆粒層などからなる層状をなしている。表皮を形成する細胞はマルビギー系細胞またはケラチノサイトと呼ばれる一般表皮細胞と木の枝のような突起を持つメラノサイトに大別される。ケラチノサイトは角化能力をもち、メラノサイトはメラニン色素の産生能力を持つことで特徴づけられる。ケラチノサイトは表皮全体を形成する主要な細胞であるが、メラノサイトは表皮の胚芽層に主に存在する。表皮の最外部は角質層と呼ばれ、ケラチンを大量に含んだ、鱗片状の細胞の死骸の堆積物である。上皮細胞の更新は、最深部の胚芽層において新生したケラチノサイトが角質層の上端に達して脱落するという過程を経て約15~30日間で行われる。メラノサイトはメラニン色素を産生するが、色素量はメラノサイトの数に依存

するのではなく、メラノサイトの色素産生能力と色素分配能力により決定される。例えば、黒人と白人などの人種間で、メラノサイトの分布密度に差異がなく、産生されたメラニン顆粒が1ヶ所に集まると皮膚の色は白く見え、小さい顆粒が広く分散すると黒く見える。表皮は形態的にも機能的にも2つの独立した細胞要素-ケラチノサイトとメラノサイトの共生組織とみなすことができる。

【0003】上皮細胞の増殖因子としてはすでにEGF(Epidermal Growth Factor; 上皮細胞成長因子)と呼ばれる物質が実用化に向けて臨床効果(Nanney, L. B.; J Invest Dermatol, 95, 624-629, 1990)と大量生産(アース製薬、特開平02-104293号など)の両面について検討されつつある。EGFはアミノ酸53個からなる約6kDaの分子量を持つポリペプチドであり、上皮細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞の細胞増殖促進効果を有することが知られている。EGFは医療品として種々の効果が期待されており、例えば、創傷治療剤、消化性潰瘍治療剤、抗ガン剤、人工皮膚などへの応用が考えられているが、実用化には至っていない。EGFの作用効果の特徴は上皮細胞と共に線維芽細胞をも増殖させる点であり、このため、結合組織にまでおよぶ外傷の治療には適しているが、表皮のみが損傷を受けている外傷や皮膚潰瘍には最適とはいえない。EGFはまた、ガン化誘導作用を持つので、実用化には慎重にならざるを得ない。

【0004】また、EGF同様創傷治療剤として開発されつつあるFGF(線維芽細胞成長因子)も主に線維芽

細胞の増殖を促進するものであって、このため上皮細胞のみを選択的に増殖することは不可能であった。EGFと構造的に近縁であるTGF- α もまた上皮細胞の増殖を促進させる活性を有するが、その名前の由来(トランスフォーミング成長因子、すなわちガン化促進因子)のとおり細胞をガン化させる活性を併せ持つという重大な欠陥があるので、ヒトや動物への投与は難しいと考えられている。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明は従来見いだされていなかった、正常上皮細胞のみを特異的に増殖促進し線維芽細胞増殖促進作用やガン化作用を持たない薬剤を提供することを目的とするものである。

【0006】正常上皮細胞のみを選択的に増殖させることができると、結合組織にまで至らない表層の外傷や皮膚潰瘍に非常に有用である。例えば、寝たきり老人の増加で大きな問題となってきた「床ずれ」は、受診患者6万5000人を数え、潜在患者はその10倍にものぼると推定されている。これは上皮細胞の更新速度が老齢化により基礎的に低下しているために起こる症状であり、症状が悪化して皮下組織にまで損傷が広がる以前に、上皮細胞を新生させ更新能力を高めることができれば、有効な治療および予防が可能となる。結合組織に至る外傷を治癒する場合であっても、患部表面をいち早く上皮組織で覆うことができれば、患部は保護され自律的な皮膚組織更新が速やかに行われると期待できる。むしろ外傷の修復の際、線維芽細胞の増殖が進展しすぎると上皮細胞の再生が不完全な状態、いわゆる斑痕、が残ると考えられる。同様に、あらゆる外科的手術において、術後の皮膚縫合は感染防御などの意味から重要であるが、上皮組織が速やかに癒着し、かつ治癒後の表皮に痕跡が少なくなれば、非常に有用であることは確実である。従って、上皮細胞のみを選択的に増殖させる薬剤は、単独使用しても、あるいはEGFのように線維芽細胞増殖を促進する物質とともに使用しても創傷治癒に対して有効である。

【0007】正常上皮細胞のみを選択的に増殖させる薬剤は、EGFについて従来から考えられている各種の適用範囲、例えば角膜手術、抗消化性潰瘍、人工皮膚などについて、EGFよりむしろ特異性が高く効果を発揮すると期待される。さらにまた、上皮の更新を促すことから皮膚の新陳代謝を高め、肌を若々しく保つために有用であり化粧品としても広い用途が期待される。新しい用途として、育毛、術後の皮膚回復、角膜炎化した皮膚の代謝促進、日焼け後やアトピー性皮膚炎などにおける表皮の回復などが期待される。とりわけ育毛については、血行促進などにより毛根細胞を活性化する薬剤が製品化されているが、正常上皮細胞のみを選択的に増殖させる薬剤によって毛根細胞を増殖促進すれば、より直接的に効果的である。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明は、肝実質細胞増殖因子HGFを有効成分とする上皮細胞増殖促進剤の発明である。本発明において、HGFはヒトまたは動物の組織ないし血液成分由来であってよく、またHGFは遺伝子組換えにより製造したものであってよい。この場合、遺伝子組換えの宿主細胞は大腸菌、枯草菌、酵母、糸状菌、植物または動物細胞のいずれかであってもよい。

【0009】本発明の有効成分である肝実質細胞増殖因子(HGF)は本発明者らが再生肝ラット血清中から成熟肝実質細胞を*in vitro*で増殖させる因子として見いだした蛋白質である(Biochem Biophys Res Commun, 122, 1450, 1984)。本発明者らはさらに、HGFをラット血小板より単離することに成功し(FFBS Letter, 22, 311, 1987)、そのアミノ酸配列を決定した。さらに、本発明者らは、解明されたHGFアミノ酸配列をもとにヒトおよびラット由来のHGF cDNAクローニングを行い、このcDNAを動物組織に組換えて肝実質細胞増殖因子を蛋白質として得ることに成功した(ヒトHGF: Nature, 342, 440, 1989; ラットHGF: Proc. Natl. Acad. Sci, 87, 3200, 1990)。

【0010】本発明者らは多年にわたり肝実質細胞の増殖因子を研究し、その結果上記のように、HGFを単離精製することに成功した。さらにその構造と活性を詳細に検討する中でHGFに上皮細胞、すなわちメラノサイトとケラチノサイトの増殖を特異的に促進する活性を見だし、本発明を完成するに至った。すなわち、HGFは以下の実施例に述べる如く、ヒト正常表皮ケラチノサイトおよびメラノサイトの増殖を5~10ng/mlという低濃度で著しく促進するのみならず、両細胞の運動性を高める活性を有することが確認された。すなわち、創傷治癒など組織が再生されるときに重要なことは、組織を構成する細胞が増殖すると共に、増殖する細胞自身が損傷部位へ移動してゆくことであり、本発明の薬剤は完全に条件を満たしている。またHGFは元来、肝実質細胞増殖を促進する因子として発見されたポリペプチドであるが、上皮系細胞のみの増殖を促進し、間葉系細胞の増殖を促進せず、さらに細胞をガン化させる活性も持たないため、EGFと比べて非常に特異性が高く、より実用に適している。

【0011】本発明に用いられるHGFは、*in vitro*で成熟ラット肝細胞を増殖させる因子として発見された生理活性ポリペプチドであり、分子量はSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動より82~85kDである。ラットHGF分子は440アミノ酸残基からなる α 鎖と233アミノ酸残基からなる β 鎖が1個のジスルフィド結合により架橋したヘテロダイマー構造を持ち、

α 、 β 両鎖とも2個のグルコサミン型糖鎖結合部位が存在する。ヒトHGFもまた同じ生理活性を有し、440アミノ酸残基からなる α 鎖と234アミノ酸残基からなる β 鎖とからなる。 α 鎖中には線溶酵素プラスミンと同様のクリングル構造が4個存在し、 β 鎖のアミノ酸配列においてもセリンプロテアーゼ活性を有するプラスミンのB鎖と約37%のホモロジーを有する。ヒトHGF前駆体のアミノ酸配列およびこれをコードする遺伝子の塩基配列を配列図1および2に示した。

【0012】すなわち、ヒトHGFは、配列番号2に示す728このアミノ酸からなる前駆体として生成され、その後440アミノ酸残基（配列番号2における第55位のProから第494位のArgまで）からなる α 鎖と、234アミノ酸残基（配列番号2における第495位のValから第728位のSerまで）からなる β 鎖にわかれる。ラットHGFとヒトHGFのアミノ酸配列のホモロジーは α 鎖において91.6%、 β 鎖において88.9%と非常に高い相同性を持ち、その活性は全く互換性がある。

【0013】本発明のHGFは種々の方法により得ることができる。例えば、ラット、ウシなどの哺乳動物の肝臓、脾臓、肺臓、骨髓、脳、腎臓、胎盤などの臓器および血小板、白血球などの血液細胞や血漿、血清などから抽出、精製して得ることができる。また、HGFを産生する初代培養細胞や株化細胞を培養し、培養物から分離精製してHGFを得ることもできる。あるいは公知の遺伝子工学的手法(Nature, 342, 440, 1989)によりHGFをコードする遺伝子を大腸菌、枯草菌、酵母、糸状菌、植物または動物細胞等適切な宿主細胞に組み込み、この形質転換体の培養物から目的とする組換えHGFを得ることができる。

【0014】こうして得られたHGFは、そのアミノ酸配列の一部が欠失、もしくは置換したり、他のアミノ酸配列が一部挿入されていたり、あるいは糖類が同様に欠失あるいは置換されていても、上皮細胞増殖の促進活性を有する限り本発明の範囲に含まれる。本発明の有効成分であるHGFは、ヒトを含むウシ、ウマ、ラット、ヒツジなどいずれの哺乳動物に由来するものであっても優れた上皮細胞増殖の促進効果を持ち、いずれの哺乳動物に対しても有効な上皮細胞増殖効果を有する。すなわち、本発明の上皮細胞増殖促進剤はヒトのみならず動物用医薬品とすることができる。

【0015】本発明の上皮細胞増殖促進剤ならびに皮膚疾患治療剤は有効成分であるHGF単独で、あるいは他の上皮細胞増殖促進因子や既知の担体と共に外用薬または化粧品として製剤化するのが望ましい。また、本発明の治療剤および予防剤はHGF以外に製剤化に必要な添加物、例えば安定化剤、賦形剤、溶解補助剤、酸化防止剤等を含んでも良い。製剤化する場合はその用途に応じて軟膏状、ゲル状、液状など種々の剤形にして用いるこ

とができる。また、凍結乾燥により担体と共に固形化して保存し、必要に応じて液状とすることも可能である。

【0016】

【作用効果】本発明の上皮細胞増殖促進剤は、正常上皮細胞のみを特異的に増殖促進し、また、細胞運動性促進活性用を有する。このため、創傷治療、皮膚潰瘍治療を始め、消化性潰瘍治療、抗ガン、手術後の皮膚縫合、角膜手術などにおける医薬品の用途や、毛根細胞の増殖剤、さらに皮膚の新陳代謝を高める化粧品として用いることができる。また、HGFは、EGF、TGF- α 、FGFとは異なり、繊維芽細胞の増殖や細胞のガン化促進活性を有しない。このため、従来にない特異性の高い、また副作用の少ない薬剤として活用することができる。

【0017】

【実施例】以下に本発明の実施態様及び効果を明らかにするための実施例を挙げ本発明を更に詳細に説明するが、もとより本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0018】实施例1

ラット肝臓から本発明の肝実質細胞増殖因子HGFは次のようにして製造した。Wister系のラットに体重の0.2%に相当する四塩化炭素を腹腔投与し、投与後約30時間目で肝臓を摘出した。肝臓をワークリングブレンダーで粉碎した後、日立20PR-52型冷却遠心器を用いて10,000rpm20分間遠心し、上清を得た。上清を0.15M NaCl+10mMヘベス+2mM CaCl_2 +0.01%ツイン80溶液を加えた50mMトリス塩酸緩衝液(pH8.5)で4°C一昼夜透析した。透析内液を透析液で平衡化したS-セファロース(FF)(ファルマシア社製)カラムに注入し、洗浄後、NaClの濃度勾配により溶出した。肝実質細胞増殖因子はNaCl濃度0.7M付近に溶出した。次にこのHGFをブルートリスアクリルM(IBF社製)クロマトグラフィーで精製した。溶出はアルギニンの濃度勾配により行い、HGFはアルギニン濃度0.25M付近で溶出した。得られた画分を次にヘパリン-セファロース(ファルマシア社)クロマトグラフィーにより精製した。溶出はNaClの濃度勾配により行い、HGFは1M前後のNaCl濃度付近で溶出した。次にフェニル5PW(東ソー社製)クロマトグラフィーにより精製した。溶出はNaCl濃度減少およびエチレンジグリコール濃度上昇勾配により行った。ラット100匹の肝臓当たり10 μg のHGFが得られた。HGFの比活性は約50万単位/mgであった。得られたHGFに0.25%BSA(ウシ血清アルブミン)を加え、PBS(リン酸緩衝食塩水)にて透析した。

【0019】实施例2

遺伝子組換え法によりヒト細胞由来の肝実質細胞増殖因子HGFを製造した。Wiglerの方法(Cell,

11, 223, 1977)に記載された方法に従って、ヒト肝実質細胞増殖因子のアミノ酸配列をコードする遺伝子により形質転換されたマウスC127細胞を培養し、その培養液上清より、ヒト肝実質細胞増殖因子を得た。すなわち、ヒト肝臓のmRNAから作られたcDNAライブラリーをスクリーニングし、ヒト肝実質細胞増殖因子のアミノ酸配列をコードするクローンHAC19とHBC25を得た。HAC19からのDNAをBamHIとScaIで、HBC25からのDNAをScaIとPstIで消化し、それぞれ得られた2つのDNAフラグメントをブルースクリプトKSIのBamHIとPstI部位に連結し挿入し、pBS[hHGFII]を得た。pBS[hHGFII]をXbaIとSalIとNaclで消化し、更にT4DNAポリメラーゼで平滑末端とした後、ヒト肝実質細胞増殖因子をコードする約3KbのDNAフラグメントを、ウシバビロームウイルスDNAをベクターとする発現ベクターpBPMTのEcoRV部位に挿入し、pBPMT[hHGFII]を得た。得られた肝実質細胞増殖因子発現ベクターpBPMT[hHGFII]を用いて、リン酸カルシウム法によりマウスC127細胞を形質転換した。形質転換体の選択は、G418を含む培地で増殖させることにより行った。得られた形質転換体の中から、高い肝実質細胞増殖因子産生能を示す細胞株BPH89を選び出した。BPH89細胞を牛胎児血清を加えた培地で増殖させた後、培地を2日おきに交換して、肝実質細胞増殖因子HGFを実施例1の精製法に準じた方法により精製した。

【0020】ヒト白血球のmRNA由来のcDNAライブラリーを用いて、上記と同様の方法でHGFを得た。

【0021】実施例3 ヒト正常表皮メラノサイトの増殖に対する効果

本発明の上皮細胞増殖促進剤の有効成分であるHGFの、メラノサイトに対する増殖促進作用を以下の方法により確認した。MCDB153(高アミノ酸タイプ)培地にインスリン5 μ g/ml、ヒドロコチゾン0.5 μ g/ml、フォルボール 12-ミリスレート 13-アセテート(PMA)10ng/mlを加えた無血清基礎培地を用いてヒト正常表皮メラノサイト(クラボウ株式会社)を懸濁し、12穴プラスチックプレートに10⁴個/ウェルになるように蒔いた。10%CO₂、25%O₂、65%N₂の条件下37℃で培養した。24時間培養後、無血清基礎培地にHGFを0から20ng/mlの範囲で段階的に加えた試験培地に交換し、培養を続けた。培養開始9日後に再びHGFを加えた試験培地を用いて培地交換をした後、15日後培養を終了し、最終細胞数をヘモサイトメーターにてカウントした。その結果、図1に示す如く正常メラノサイトはHGFにより0~10ng/mlの範囲で用量依存的に増殖を促進され、最適濃度において約5倍にまで高められることが確認された。

【0022】実施例4 ヒト正常表皮メラノサイトの複製DNA合成に対する効果

実施例3に記載された無血清基礎培地にヒト正常表皮メラノサイトを懸濁し、24穴プラスチックプレートに4×10⁴個/ウェルになるように蒔いた。10%CO₂、25%O₂、65%N₂の条件下37℃で培養した。24時間培養後、無血清基礎培地にHGFを0から20ng/mlの範囲で段階的に加えた試験培地に交換し、培養を続けた。24時間培養後、0.5 μ Ciの[¹²⁵I]デオキシウリジンを各ウェルに添加した。さらに4時間培養して細胞に[¹²⁵I]を取り込ませた後、細胞をpH7.4のPBS(リン酸塩緩衝液)にて洗浄し、冷10%トリクロロ酢酸水溶液で固定した。細胞を1N水酸化ナトリウム水溶液で可溶化し、その放射能をガンマカウンターにより測定した。また放射能測定後の試料の一部をとってMicro BCA Protein Assay System(ピアース社)により蛋白質量を測定した。細胞内に取り込まれた標識デオキシウリジンの量をコントロールとのカウント差として求め、これをヒト正常表皮メラノサイト蛋白質1mgあたりに換算してDNA合成活性(dpm/mg蛋白質)とした。その結果、図2に示す如く正常メラノサイトHGFにより0~10ng/mlの範囲で用量依存的に複製DNA合成を促進され、最適濃度において約4倍にまで高められることが確認された。

【0023】実施例5 ヒト正常表皮ケラチノサイトの増殖に対する効果

本発明の上皮細胞増殖促進剤の有効成分であるHGFの、ケラチノサイトに対する増殖促進作用を以下の方法により確認した。実施例1に記載された無血清基礎培地にウシ視床下部抽出物150 μ g蛋白質/mlを加えた培地にヒト正常表皮ケラチノサイトを懸濁し、12穴プラスチックプレートに10⁴個/ウェルになるように蒔いた。10%CO₂、25%O₂、65%N₂の条件下37℃で培養した。24時間培養後、カルシウムイオン濃度を1.8mMに調整した無血清基礎培地に交換し、さらに24時間培養後HGFを0から20ng/mlの範囲で段階的に添加し、培養を続けた。培養開始6日後、培地をHGFを加えた新しい培地に交換して培養を続け、4日後(培養開始から10日後)培養を終了し、最終細胞数をヘモサイトメーターにてカウントした。その結果、図3に示す如く正常ケラチノサイトはHGFにより0~2.5ng/mlの範囲で用量依存的に増殖を促進され、最適濃度において約3倍にまで高められることが確認された。

【0024】実施例6 ヒト正常表皮ケラチノサイトの複製DNA合成に対する効果

実施例3に記載された無血清基礎培地にウシ視床下部抽出物150 μ g蛋白質/mlを加えた培地にヒト正常表皮ケラチノサイトを懸濁し、24穴プラスチックプレ

トに 4×10^4 個/ウェルになるように蒔いた。10% CO_2 、25% O_2 、65% N_2 の条件下37℃で培養した。24時間培養後、カルシウムイオン濃度を1.8 mMに調整した無血清基礎培地に交換し、さらに24時間培養後HGFを0から20 ng/mlの範囲で段階的に添加し、培養を続けた。24時間培養後、0.5 μCi の [^{125}I] デオキシウリジンを各ウェルに添加した。さらに4時間培養して細胞に [^{125}I] を取り込ませた後、細胞をpH7.4のPBS（リン酸食塩緩衝液）にて2回洗浄し、冷10%トリクロ酢酸水溶液で固定した。細胞を1N水酸化ナトリウム水溶液で可溶化し、その放射能をガンマカウンターにより測定した。また放射能測定後の試料の一部をとってMicro BCA Protein Assay System（ピアース社）により蛋白質量を測定した。細胞内に取り込まれた標識デオキシウリジンの量をコントロールとのカウント差として求め、これをヒト正常表皮メラノサイト蛋白質1 mgあたりに換算してDNA合成活性（dpm/mg蛋白質）とした。その結果、図4に示す如く正常メラノサイトHGFにより0~5 ng/mlの範囲で用量依存的に複製DNA合成を促進され、最適濃度において約2倍にまで高められることが確認された。

【0025】実施例7 ヒト正常表皮ケラチノサイトの増殖に対する効果

実施例3に記載された無血清基礎培地にウシ視床下部抽出物150 μg 蛋白質/mlを加えた培地にヒト正常表皮ケラチノサイトを懸濁し、12穴プラスチックプレートに 2×10^4 個/ウェルになるように蒔いた。10% CO_2 、25% O_2 、65% N_2 の条件下37℃で培養した。2日間培養後、カルシウムイオン濃度を1.8 mMに調整した無血清基礎培地に交換し、さらに2日間培養後HGFを2.5 ng/ml添加し、培養を続けた。24時間培養後（培養開始から5日後）、細胞の増殖程度を顕微鏡下で観察した。その結果、図5に示す如く、HGF添加培養液で培養した正常ケラチノサイトは無添加の場合に比して明らかに増殖が促進されていた。

【0026】実施例8 ヒト正常表皮ケラチノサイトの細胞運動性に対する効果

本発明の上皮細胞増殖促進剤の有効成分であるHGF

の、ケラチノサイトの細胞運動性に対する促進作用を以下の方法により確認した。実施例3に記載された無血清基礎培地にウシ視床下部抽出物150 ng蛋白質/mlを加えた培地にヒト正常表皮ケラチノサイトを懸濁し、12穴プラスチックプレートに 2×10^4 個/ウェルになるように蒔いた。10% CO_2 、25% O_2 、65% N_2 の条件下37℃で培養した。2日間培養後、ウシ視床下部抽出物を添加しない無血清基礎培地に交換し、さらに24時間培養後HGFを0から10 ng/mlの範囲で段階的に添加し、培養を続けた。24時間後（培養開始から4日後）培養を終了し、細胞の状態を顕微鏡下で観察した。その結果、図6に示す如く、HGF添加培養液で培養したヒト正常表皮ケラチノサイトは無添加のものに比べて細胞同士の接着が弱まり、細胞の運動性が高まっていることが確認された。

【0027】実験例 ヒト正常表皮ケラチノサイトの細胞運動性に対するEGF、TGF- α の効果

本発明の上皮細胞増殖促進剤の有効成分であるHGFと同様に上皮の細胞を増殖するEGF、TGF- α のケラチノサイトの細胞運動性に対する促進作用を、実施例8と同様の方法により確認した。実施例3に記載された無血清基礎培地にウシ視床下部抽出物150 μg 蛋白質/mlを加えた培地にヒト正常表皮ケラチノサイトを懸濁し、12穴プラスチックプレートに 2×10^4 個/ウェルになるように蒔いた。10% CO_2 、25% O_2 、65% N_2 の条件下37℃で培養した。2日間培養後、ウシ視床下部抽出物を添加しない無血清基礎培地に交換し、さらに24時間培養後EGFまたはTGF- α を10 ng/mlの濃度で添加し、培養を続けた。24時間後（培養開始から4日後）培養を終了し、細胞の状態を顕微鏡下で観察した。その結果、図7に示す如く、EGF、TGF- α 添加培養液で培養したヒト正常表皮ケラチノサイトは第6図のHGF添加培養の場合に比べて細胞同士の接着に変化がなく、細胞の運動性を促進する効果が無いことが確認された。

【0028】

【配列表】

配列番号：1
 配列の長さ：2184
 配列の型：核酸
 鎖の数：二本鎖
 トポロジー：直鎖状
 配列の種類：cDNA

ATGTGGGTGA CCAAACCTCT GCCAGCCCTG CTGCTGCAGC ATGTCCTCCT GCATCTCCTC 60
 CTGCTCCCCA TCGCCATCCC CTATGCAGAG GGACAAAGGA AAAGAAGAAA TACAATTCAT 120
 GAATTCAAAA AATCAGCAAA GACTACCCCTA ATCAAAATAG ATCCAGCACT GAAGATAAAA 180
 ACCAAAAAAG TGAATACTGC AGACCAATGT GCTAATAGAT GTACTAGGAA TAAAGGACTT 240
 CCATTCACCTT GCAAGGCTTT TGTTTTGTAT AAAGCAAGAA AACAATGCCT CTGGTCCCCC 300
 TTCAATAGCA TGCAAGTGG AGTGAAAAAA GAATTTGGCC ATGAATTTGA CCTCTATGAA 360
 AACAAAGACT ACATTAGAAA CTGCATCATT GGTAAAGGAC GCAGCTACAA GGGAACAGTA 420
 TCTATCACTA AGAGTGCCAT CAAATGTCAG CCTGGAGTT CCATGATACC ACACGAACAC 480
 AGCTTTTTGC CTTCGAGCTA TCGGGGTAAA GACCTACAGG AAACTACTG TCGAAATCCT 540
 CGAGGGGAAG AAGGGGGACC CTGGTGTTC ACAAGCAATC CAGAGGTACG CTACGAAGTC 600
 TGTGACATTC CTCAGTGTTC AGAAGTTGAA TGCATGACCT GCAATGGGGA GAGTTATCGA 660
 GGTCTCATGG ATCATACAGA ATCAGGCAAG ATTTGTCAGC GCTGGGATCA TCAGACACCA 720
 CACCGGCACA AATTCTTGCC TGAAAGATAT CCCGACAAGG GCTTTGATGA TAATTATTGC 780
 CGCAATCCCG ATGCCCAGCC GAGGCCATGG TGCTATACTC TTGACCCTCA CACCCGCTGG 840
 GAGTACTGTG CAATTAACAC ATGCGCTGAC AATACTATGA ATGACACTGA TGTTCCITTTG 900
 GAAACAACCTG AATGCATCCA AGGTCAAGGA GAAGGCTACA GGGGCACTGT CAATACCATT 960
 TGGAATGGAA TTCCATGTCA GCGTTGGGAT TCTCAGTATC CTCACGAGCA TGACATGACT 1020
 CCTGAAATTT TCAAGTGCAA GGACCTACGA GAAAATTACT GCGGAAATCC AGATGGGTCT 1080
 GAATCACCCT GGTGTTTAC CACTGATCCA AACATCCGAG TTGGCTACTG CTCCCAAATT 1140
 CCAAACCTGT ATATGTCACA TGGACAAGAT TGTATCGTG GGAATGGCAA AAATTATATG 1200

GGCAACTTAT CCCAAACAAG ATCTGGACTA ACATGTTCAA TGTGGGACAA GAACATGGAA 1260
 GACTTACATC GTCATATCTT CTGGGAACCA GATGCAAGTA AGCTGAATGA GAATTACTGC 1320
 CGAAATCCAG ATGATGATGC TCATGGACCC TGGTGCTACA CCGGAAATCC ACTCATTCTT 1380
 TGGGATTATT GCCCTATTTC TCGTTGTGAA GGTGATACCA CACCTACAAT AGTCAATTTA 1440
 GACCATCCCG TAATATCTTG TGCCAAACG AAACAATTGC GAGTTGTAAA TGGGATTCCA 1500
 ACACGAACAA ACATAGGATG GATGGTTAGT TTGAGATACA GAAATAAACA TATCTGCGGA 1560
 GGATCATTGA TAAAGGAGAG TTGGGTCTT ACTGCACGAC AGTGTTCCTT TTCTCGAGAC 1620
 TTGAAAGATT ATGAAGCTTG GCTTGGAATT CATGATGTCC ACGGAAGAGG AGATGAGAAA 1680
 TGCAACAGG TTCTCAATGT TTCCAGCTG GTATATGGCC CTGAAGGATC AGATCTGGTT 1740
 TTAATGAAGC TTGCCAGGCC TGCTGTCTTG GATGATTTTG TTAGTACGAT TGATTTACCT 1800
 AATTATGGAT GCACAATTCC TGAAAAGACC AGTTGCAGTG TTTATGGCTG GGGCTACACT 1860
 GGATTGATCA ACTATGATGG CCTATTACGA GTGGCACATC TCTATATAAT GGGAAATGAG 1920
 AAATGCAGCC AGCATCATCG AGGGAAGGTG ACTCTGAATG AGTCTGAAAT ATGTGCTGGG 1980
 GCTGAAAAGA TTGGATCAGG ACCATGTGAG GGGGATTATG GTGGCCCACT TGTGTGTGAG 2040
 CAACATAAAA TGAGAATGGT TCTTGGTGTG ATTTGTTCTG GTCGTGGATG TGCCATTCCA 2100
 AATCGTCTTG GTATTTTGT CCGAGTAGCA TATTATGCAA AATGGATACA CAAAATTATT 2160
 TTAACATATA AGGTACCACA GTCA 2184

配列番号: 2

配列の長さ: 728

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 蛋白質

配列

Met	Trp	Val	Thr	Lys	Leu	Leu	Pro	Ala	Leu	Leu	Leu	Gln	His	Val
1				5					10					15
Leu	Leu	His	Leu	Leu	Leu	Leu	Pro	Ile	Ala	Ile	Pro	Tyr	Ala	Glu
				20					25					30
Gly	Gln	Arg	Lys	Arg	Arg	Asn	Thr	Ile	His	Glu	Phe	Lys	Lys	Ser
				35					40					45
Ala	Lys	Thr	Thr	Leu	Ile	Lys	Ile	Asp	Pro	Ala	Leu	Lys	Ile	Lys
				50					55					60
Thr	Lys	Lys	Val	Asn	Thr	Ala	Asp	Gln	Cys	Ala	Asn	Arg	Cys	Thr
				65					70					75
Arg	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Phe	Thr	Cys	Lys	Ala	Phe	Val	Phe	Asp
				80					85					90
Lys	Ala	Arg	Lys	Gln	Cys	Leu	Trp	Phe	Pro	Phe	Asn	Ser	Met	Ser
				95					100					105
Ser	Gly	Val	Lys	Lys	Glu	Phe	Gly	His	Glu	Phe	Asp	Leu	Tyr	Glu
				110					115					120
Asn	Lys	Asp	Tyr	Ile	Arg	Asn	Cys	Ile	Ile	Gly	Lys	Gly	Arg	Ser
				125					130					135
Tyr	Lys	Gly	Thr	Val	Ser	Ile	Thr	Lys	Ser	Gly	Ile	Lys	Cys	Gln
				140					145					150
Pro	Trp	Ser	Ser	Met	Ile	Pro	His	Glu	His	Ser	Phe	Leu	Pro	Ser
				155					160					165

Ser Tyr Arg Gly Lys Asp Leu Gln Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro		
170	175	180
Arg Gly Glu Glu Gly Gly Pro Trp Cys Phe Thr Ser Asn Pro Glu		
185	190	195
Val Arg Tyr Glu Val Cys Asp Ile Pro Gln Cys Ser Glu Val Glu		
200	205	210
Cys Met Thr Cys Asn Gly Glu Ser Tyr Arg Gly Leu Met Asp His		
215	220	225
Thr Glu Ser Gly Lys Ile Cys Gln Arg Trp Asp His Gln Thr Pro		
230	235	240
His Arg His Lys Phe Leu Pro Glu Arg Tyr Pro Asp Lys Gly Phe		
245	250	255
Asp Asp Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Gln Pro Arg Pro Trp		
260	265	270
Cys Tyr Thr Leu Asp Pro His Thr Arg Trp Glu Tyr Cys Ala Ile		
275	280	285
Lys Thr Cys Ala Asp Asn Thr Met Asn Asp Thr Asp Val Pro Leu		
290	295	300
Glu Thr Thr Glu Cys Ile Gln Gly Gln Gly Glu Gly Tyr Arg Gly		
305	310	315
Thr Val Asn Thr Ile Trp Asn Gly Ile Pro Cys Gln Arg Trp Asp		
320	325	330
Ser Gln Tyr Pro His Glu His Asp Met Thr Pro Glu Asn Phe Lys		
335	340	345
Cys Lys Asp Leu Arg Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Ser		
350	355	360
Glu Ser Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Asn Ile Arg Val Gly		
365	370	375

Tyr Cys Ser Gln Ile Pro Asn Cys Asp Met Ser His Gly Gln Asp	380	385	390
Cys Tyr Arg Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Met Gly Asn Leu Ser Gln	395	400	405
Thr Arg Ser Gly Leu Thr Cys Ser Met Trp Asp Lys Asn Met Glu	410	415	420
Asp Leu His Arg His Ile Phe Trp Glu Pro Asp Ala Ser Lys Leu	425	430	435
Asn Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asp Asp Ala His Gly Pro	440	445	450
Trp Cys Tyr Thr Gly Asn Pro Leu Ile Pro Trp Asp Tyr Cys Pro	455	460	465
Ile Ser Arg Cys Glu Gly Asp Thr Thr Pro Thr Ile Val Asn Leu	470	475	480
Asp His Pro Val Ile Ser Cys Ala Lys Thr Lys Gln Leu Arg Val	485	490	495
Val Asn Gly Ile Pro Thr Arg Thr Asn Ile Gly Trp Met Val Ser	500	505	510
Leu Arg Tyr Arg Asn Lys His Ile Cys Gly Gly Ser Leu Ile Lys	515	520	525
Glu Ser Trp Val Leu Thr Ala Arg Gln Cys Phe Pro Ser Arg Asp	530	535	540
Leu Lys Asp Tyr Glu Ala Trp Leu Gly Ile His Asp Val His Gly	545	550	555
Arg Gly Asp Glu Lys Cys Lys Gln Val Leu Asn Val Ser Gln Leu	560	565	570
Val Tyr Gly Pro Glu Gly Ser Asp Leu Val Leu Met Lys Leu Ala	575	580	585

Arg Pro Ala Val Leu Asp Asp Phe Val Ser Thr Ile Asp Leu Pro
 590 595 600
 Asn Tyr Gly Cys Thr Ile Pro Glu Lys Thr Ser Cys Ser Val Tyr
 605 610 615
 Gly Trp Gly Tyr Thr Gly Leu Ile Asn Tyr Asp Gly Leu Leu Arg
 620 625 630
 Val Ala His Leu Tyr Ile Met Gly Asn Glu Lys Cys Ser Gln His
 635 640 645
 His Arg Gly Lys Val Thr Leu Asn Glu Ser Glu Ile Cys Ala Gly
 650 655 660
 Ala Glu Lys Ile Gly Ser Gly Pro Cys Glu Gly Asp Tyr Gly Gly
 665 670 675
 Pro Leu Val Cys Glu Gln His Lys Met Arg Met Val Leu Gly Val
 680 685 690
 Ile Val Pro Gly Arg Gly Cys Ala Ile Pro Asn Arg Pro Gly Ile
 695 700 705
 Phe Val Arg Val Ala Tyr Tyr Ala Lys Trp Ile His Lys Ile Ile
 710 715 720
 Leu Thr Tyr Lys Val Pro Gln Ser
 728

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】図面の簡単な説明

【補正方法】変更

【補正内容】

【図面の簡単な説明】

【図1】ヒト正常表皮メラノサイトの増殖に対するHGFの促進効果を示す図。●は各HGF濃度における培養終了時の細胞数（実施例3）。

【図2】ヒト正常表皮メラノサイトの増殖に対するHGFの促進効果を示す図。●は各HGF濃度における培養終了時の蛋白質質量当たりのDNA合成量（実施例4）。

【図3】ヒト正常表皮ケラチノサイトの増殖に対するHGFの促進効果を示す図。●は各HGF濃度における培養終了時の細胞数（実施例5）。

【図4】ヒト正常表皮ケラチノサイトの増殖に対するHGFの促進効果を示す図。●は各HGF濃度における培養

* 養終了時の蛋白質質量当たりのDNA合成量（実施例6）。

【図5】ヒト正常表皮ケラチノサイトの増殖に対するHGFの促進効果を示す顕微鏡観察写真。（a）はHGF無添加培養、（b）はHGF 2.5 ng/ml 添加培養（実施例7）。生物の形態に関する写真である。

【図6】ヒト正常表皮ケラチノサイトの運動性に対するHGFの促進効果を示す顕微鏡観察写真。（a）はHGF無添加培養、（b）はHGF 1 ng/ml 添加培養、（c）はHGF 10 ng/ml 添加培養（実施例8）。生物の形態に関する写真である。

【図7】ヒト正常表皮ケラチノサイトの運動性に対するEGF、TGF- α の促進効果を示す顕微鏡観察写真。（a）はEGF、（b）はTGF- α をそれぞれ10 ng/ml 添加培養したもの（実験例）。生物の形態に関する写真である。

【手続補正書】

【提出日】平成9年12月29日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正内容】

【書類名】明細書

【発明の名称】上皮細胞増殖促進剤

【特許請求の範囲】

【請求項1】 肝実質細胞増殖因子HGFを有効成分とするヒト又は哺乳動物用上皮細胞増殖促進剤。

【請求項2】 HGFが遺伝子組換えにより製造したものである請求項1記載の上皮細胞増殖促進剤。

【請求項3】 上皮細胞が皮膚表皮細胞である請求項1記載の上皮細胞増殖促進剤。

【請求項4】 HGFを有効成分とする創傷治療又は

皮膚潰瘍治療剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は肝実質細胞増殖因子を有効成分として含有してなる上皮細胞増殖促進剤に関する。

【0002】

【従来の技術】皮膚は、表皮、真皮、皮下組織の3層からなり、表皮はいわゆる上皮であり外胚葉に由来するのに対し、真皮、皮下組織は中胚葉（間葉）に由来する結合組織である。表皮は胚芽層（基底層）、有きよ層、顆粒層などからなる層状をなしている。表皮を形成する細胞はマルピギー系細胞またはケラチノサイトとよばれる一般表皮細胞と木の枝のような突起を持つメラノサイトに大別される。ケラチノサイトは角化能力をもち、メラノサイトはメラニン色素の産生能力を持つことで特徴づけられる。ケラチノサイトは表皮全体を形成する主要な細胞であるが、メラノサイトは表皮の胚芽層に主に存在する。表皮の最外部は角質層と呼ばれ、ケラチンを大量に含んだ、鱗片状の細胞の死骸の堆積物である。上皮細胞の更新は、最深部の胚芽層において新生したケラチノサイトが角質層の上端に達して脱落するという過程を経て約15～30日間で行われる。メラノサイトはメラニン色素を産生するが、色素量はメラノサイトの数に依存するのではなく、メラノサイトの色素産生能力と色素分配能力により決定される。例えば、黒人と白人などの人種間で、メラノサイトの分布密度に差異がなく、産生されたメラニン顆粒が1ヵ所に集まると皮膚の色は白く見え、小さい顆粒が広く分散すると黒く見える。表皮は形態的にも機能的にも2つの独立した細胞要素—ケラチノサイトとメラノサイトの共生組織とみなすことができる。

【0003】上皮細胞の増殖因子としてはすでにEGF（Epidermal Growth Factor；上皮細胞成長因子）と呼ばれる物質が実用化に向けて臨床効果（Nanney, L. B; J Invest Dermatol, 95, 624-629, 1990）と大量生産（アース製薬、特開平2-104293号など）の両面について検討されつつある。EGFはアミノ酸53個からなる約6kDaの分子量を持つポリペプチドであり、上皮細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞の細胞増殖促進効果を有することが知られている。EGFは医薬品として種々の効果が期待されており、例えば、創傷治療剤、消化性潰瘍治療剤、抗ガン剤、人工皮膚などへの応用が考えられているが、実用化には至っていない。EGFの作用効果の特徴は上皮細胞と共に線維芽細胞をも増殖させる点であり、このため、結合組織にまでおよぶ外傷の治療には適しているが、表皮のみが損傷を受けている外傷や皮膚潰瘍には最適とは言い難い。EGFはまた、ガン化誘導作用を持つので、実用化には慎重になら

ざるを得ない。

【0004】また、EGF同様創傷治療剤として開発されつつあるFGF（線維芽細胞成長因子）も主に線維芽細胞の増殖を促進するものであって、このため上皮細胞のみを選択的に増殖することは不可能であった。EGFと構造的に近縁であるTGF- α 。もまた上皮細胞の増殖を促進させる活性を有するが、その名前の由来（トランスフォーミング成長因子、すなわちガン化促進因子）のとおり細胞をガン化させる活性を併せ持つという重大な欠陥があるので、ヒトや動物への投与は難しいと考えられている。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明は従来見出されていなかった、正常上皮細胞のみを特異的に増殖促進し、線維芽細胞増殖促進作用やガン化作用を持たない薬剤を提供することを目的とするものである。

【0006】正常上皮細胞のみを選択的に増殖させることができると、結合組織にまで至らない表層の外傷や皮膚潰瘍に非常に有用である。例えば、寝たきり老人の増加で大きな問題となってきた「床ずれ」は、受診患者6万5000人を数え、潜在患者はその10倍にものぼると推定されている。これは上皮細胞の更新速度が老齢化により基礎的に低下しているために起こる症状であり、症状が悪化して皮下組織にまで損傷が広がる以前に、上皮細胞を新生させ更新能力を高めることができれば、有効な治療及び予防が可能となる。結合組織に至る外傷を治療する場合であっても、患部表面をいち早く上皮組織で覆うことができれば、患部は保護され自律的な皮膚組織更新が速やかに行われると期待できる。むしろ外傷の修復の際、線維芽細胞の増殖が進展しすぎると上皮細胞の再生が不完全な状態、いわゆる斑痕、が残ると考えられる。同様に、あらゆる外科的手術において、術後の皮膚縫合は感染防御などの意味から重要であるが、上皮組織が速やかに癒着し、かつ治療後の表皮に痕跡が少なくなれば、非常に有用であることは確実である。従って、上皮細胞のみを選択的に増殖させる薬剤は、単独使用しても、あるいはEGFのように線維芽細胞増殖を促進する物質とともに使用しても創傷治療に対して有効である。

【0007】正常上皮細胞のみを選択的に増殖させる薬剤は、EGFについて従来から考えられている各種の適用範囲、例えば角膜手術、抗消化性潰瘍、人工皮膚などについて、EGFよりむしろ特異性が高く効果を発揮すると期待される。さらにまた、上皮の更新を促すことから皮膚の新陳代謝を高め、肌を若々しく保つために有用であり化粧品としても広い用途が期待される。新しい用途として、育毛、術後の皮膚回復、角質化した皮膚の代謝促進、日焼け後やアトピー性皮膚炎などにおける表皮の回復などが期待される。とりわけ育毛については、血行促進などにより毛根細胞を活性化させる薬剤が製品化さ

れているが、正常上皮細胞のみを選択的に増殖させる薬剤によって毛根細胞を増殖促進すれば、より直接的に効果的である。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明は、肝実質細胞増殖因子HGFを有効成分とする上皮細胞増殖促進剤の発明である。本発明において、HGFはヒトまたは動物の組織ないし血液成分由来であってよく、またHGFは遺伝子組換えにより製造したものであってよい。この場合、遺伝子組換えの宿主細胞は大腸菌、枯草菌、酵母、糸状菌、植物又は動物細胞のいずれかであってもよい。

【0009】本発明の有効成分である肝実質細胞増殖因子(HGF)は本発明者等が再生肝ラット血清中から成熟肝実質細胞を*in vitro*で増殖させる因子として見いだした蛋白質である(Biochem Biophys Res Commun, 122, 1450, 1984)。本発明者等は更に、HGFをラット血小板より単離することに成功し(FEBS Letter, 22, 311, 1987)、そのアミノ酸配列を決定した。さらに、本発明者等は、解明されたHGFアミノ酸配列をもとにヒトおよびラット由来のHGF cDNAクローニングを行い、このcDNAを動物組織に組換えて肝実質細胞増殖因子を蛋白質として得ることに成功した(ヒトHGF: Nature, 342, 440, 1989; ラットHGF: Proc. Natl. Acad. Sci., 87, 3200, 1990)。

【0010】本発明者等は多年にわたり肝実質細胞の増殖因子を研究し、その結果上記のように、HGFを単離精製することに成功した。さらにその構造と活性を詳細に検討する中でHGFに上皮細胞、すなわちメラノサイトとケラチノサイトの増殖を特異的に促進する活性を見出し、本発明を完成するに至った。すなわち、HGFは以下の実施例に述べるごとく、ヒト正常表皮ケラチノサイトおよびメラノサイトの増殖を5~10ng/mlという低濃度で著しく促進するのみならず、両細胞の運動性を高める活性を有することが確認された。すなわち、創傷治癒など組織が再生されるときに重要なことは、組織を構成する細胞が増殖すると共に、増殖する細胞自身が損傷部位へ移動してゆくことであり、本発明の薬剤は完全に条件を満たしている。またHGFは元来、肝実質細胞増殖を促進する因子として発見されたポリペプチドであるが、上皮系細胞のみの増殖を促進し、間葉系細胞の増殖を促進せず、さらに細胞をガン化させる活性も持たないため、EGFと比べて非常に特異性が高く、より実用に適している。

【0011】本発明に用いられるHGFは、*in vitro*で成熟ラット肝細胞を増殖させる因子として発見された生理活性ポリペプチドであり、分子量はSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動より82~85kDである。ラットHGF分子は440アミノ酸残基からなる

α 鎖と233アミノ酸残基からなる β 鎖が1個のジスルフィド結合により架橋したヘテロダイマー構造を持ち、 α 、 β 両鎖とも2個のグルコサミン型糖鎖結合部位が存在する。ヒトHGFもまた同じ生理活性を有し、440アミノ酸残基からなる α 鎖と234アミノ酸残基からなる β 鎖とからなる。 α 鎖中には線溶酵素プラスミンと同様のクリングル構造が4個存在し、 β 鎖のアミノ酸配列においてもセリンプロテアーゼ活性を有するプラスミンの β 鎖と約37%のホモロジーを有する。ヒトHGF前駆体のアミノ酸配列およびこれをコードする遺伝子の塩基配列を配列番号1及び2に示した。ラットHGFとヒトHGFのアミノ酸配列のホモロジーは α 鎖において91.6%、 β 鎖において88.9%と非常に高い相同性を持ち、その活性はまったく互換性がある。

【0012】本発明のHGFは種々の方法により得ることができる。例えば、ラット、ウシなどの哺乳動物の肝臓、脾臓、肺臓、骨髄、脳、腎臓、胎盤などの臓器及び血小板、白血球などの血液細胞や血漿、血清などから抽出、精製して得ることができる。また、HGFを産生する初代培養細胞や株化細胞を培養し、培養物から分離精製してHGFを得ることもできる。あるいは公知の遺伝子工学的手法(Nature, 342, 440, 1989)によりHGFをコードする遺伝子を大腸菌、枯草菌、酵母、糸状菌、植物または動物細胞と適切な宿主細胞に組み込み、この形質転換体の培養物から目的とする組換えHGFを得ることができる。

【0013】こうして得られたHGFは、そのアミノ酸配列の一部が欠失、もしくは置換したり、他のアミノ酸配列が一部挿入されていたり、あるいは糖類が同様に欠失あるいは置換されていても、上皮細胞増殖の促進活性を有するかぎり本発明の範囲に含まれる。本発明の有効成分であるHGFは、ヒトを含むウシ、ウマ、ラット、ヒツジなどいずれの哺乳動物に由来するものであっても優れた上皮細胞増殖の促進効果を持ち、いずれの哺乳動物に対しても有効な上皮細胞増殖効果を有する。すなわち、本発明の上皮細胞増殖促進剤はヒトのみならず動物用医薬品とすることができる。

【0014】本発明の上皮細胞増殖促進剤ならびに皮膚疾患治療剤は有効成分であるHGF単独で、あるいは他の上皮細胞増殖促進因子や既知の担体と共に外用薬または化粧品として製剤化するのが望ましい。また、本発明の治療剤および予防剤はHGF以外に製剤化に必要な添加物、例えば安定化剤、賦形剤、溶解補助剤、酸化防止剤等を含んでもよい。製剤化する場合はその用途に応じて軟膏状、ゲル状、液状など種々の剤形にして用いることができる。また、凍結乾燥により担体と共に固形化して保存し、必要に応じて液状とすることも可能である。

【0015】

【発明の効果】本発明の上皮細胞増殖促進剤は、正常上皮細胞のみを特異的に増殖促進し、また、細胞運動性促

進活性作用を有する。このため、創傷治療、皮膚潰瘍治療をはじめ、消化性潰瘍治療、抗ガン、手術後の皮膚縫合、角膜手術などにおける医薬品の用途や、毛根細胞の増殖剤、さらに皮膚の新陳代謝を高める化粧品として用いることができる。また、HGFは、EGF、TGF- α 、FGFとは異なり、線維芽細胞の増殖や細胞のガン化促進活性を有しない。このため、従来にない特異性の高い、また副作用の少ない薬剤として活用することができる。

【0016】

【実施例】以下に本発明の実施態様及び効果を明らかにするための実施例を挙げ本発明を更に詳細に説明するが、もとより本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0017】実施例1

ラット肝臓から本発明の肝実質細胞増殖因子HGFは次のようにして製造した。ウィスター(Wistar)系のラットに体重の0.2%に相当する四塩化炭素を腹腔投与し、投与後約30時間目で肝臓を摘出した。肝臓をワーキングブレンダーで粉砕した後、日立20PR-52型冷却遠心機を用いて10,000rpm20分間遠心し、上清を得た。上清を0.15M NaCl+10mMヘセス+2mM CaCl₂+0.01% Tween 80溶液を加えた50mMトリス塩酸緩衝液(pH8.5)で4℃一昼夜透析した。透析内液を透析液で平衡化したS-セファロース(FF)(ファルマシア社製)カラムに注入し、洗浄後、NaClの濃度勾配により溶出した。肝実質細胞増殖因子はNaCl濃度0.7M付近に溶出した。次ぎにこのHGFをブルートリスアクリルM(IBF社製)クロマトグラフィーで精製した。溶出はアルギニンの濃度勾配により行い、HGFはアルギニン濃度0.25M付近で溶出した。得られた画分を次にヘパリン-セファロース(ファルマシア社製)クロマトグラフィーにより精製した。溶出はNaClの濃度勾配により行い、HGFは1M前後のNaCl濃度付近で溶出した。次にフェニル5PW(東ソー社製)クロマトグラフィーにより精製した。溶出はNaCl濃度減少およびエチレングリコール濃度上昇勾配により行った。ラット100匹の肝臓あたり10 μ gのHGFが得られた。HGFの比活性は約50万単位/mgであった。得られたHGFに0.25%BSA(ウシ血清アルブミン)を加え、PBS(リン酸緩衝食塩水)にて透析した。

【0018】実施例2

遺伝子組換え法によりヒト細胞由来の肝実質細胞増殖因子HGFを製造した。Wiglerらの方法(Cell, 11, 223, 1977)に記載された方法に従って、ヒト肝実質細胞増殖因子の amino 酸配列をコードする遺伝子により形質転換されたマウスC127細胞を培養し、その培養液上清より、ヒト肝実質細胞増殖因子を得た。すなわち、ヒト肝臓のmRNAから作られたcD

NAライブラリーをスクリーニングし、ヒト肝実質細胞増殖因子の amino 酸配列をコードするクローンHAC19とHBC25を得た。HAC19からのDNAをBamHIとScaIで、HBC25からのDNAをScaIとPstIで消化し、それぞれ得られた2つのDNAフラグメントをブルースクリプトKSIのBamHIとPstI部位に連結し挿入し、pBS[hHGF I]を得た。pBS[hHGF I]をXbaIとSalIとNaeIで消化し、更にT4DNAポリメラーゼで平滑末端とした後、ヒト肝実質細胞増殖因子をコードする約3KbのDNAフラグメントを、ウシバビロウマウイルスDNAをベクターとする発現ベクターpBPM TのEcoRV部位に挿入し、pBPMT[hHGF I]を得た。得られた肝実質細胞増殖因子発現ベクターpBPMT[hHGF I]を用いて、リン酸カルシウム法によりマウスC127細胞を形質転換した。形質転換体の選択は、G418を含む培地で増殖させることにより行った。得られた形質転換体の中から、高い肝実質細胞増殖因子産生能を示す細胞株BPH89を選び出した。BPH89細胞を牛胎児血清を加えた培地で増殖させた後、培地を2日おきに交換して、肝実質細胞増殖因子HGFを実施例1の精製法に準じた方法により精製した。

【0019】ヒト白血球のmRNA由来のcDNAライブラリーを用いて、上記と同様の方法でHGFを得た。

【0020】実施例3

ヒト正常表皮メラノサイトの増殖に対する効果

本発明の上皮細胞増殖促進剤の有効成分であるHGFの、メラノサイトに対する増殖促進作用を以下の方法により確認した。MCDB153(高アミノ酸タイプ)培地にインスリン5 μ g/ml、ヒドロコチゾン0.5 μ g/ml、フォルボール12-ミリステート13-アセテート(PMA)10ng/mlを加えた無血清基礎培地を用いてヒト正常表皮メラノサイト(クラボウ株式会社)を懸濁し、12穴プラスチックプレートに10⁴個/ウェルになるように蒔いた。10%CO₂、25%O₂、65%N₂の条件下37℃で培養した。24時間培養後、無血清基礎培地にHGFを0から20ng/mlの範囲で段階的に加えた試験培地に交換し、培養を続けた。培養開始9日後に再びHGFを加えた試験培地を用いて培地交換をした後、15日後培養を終了し、最終細胞数をヘモサイトメーターにてカウントした。その結果、図1に示す如く正常メラノサイトはHGFにより0~10ng/mlの範囲で容量依存的に増殖を促進され、最適濃度において約5倍にまで高められることが確認された。

【0021】実施例4

ヒト正常表皮メラノサイトの複製DNA合成に対する効果

実施例3に記載された無血清基礎培地にヒト正常表皮メ

ラノサイトを懸濁し、24穴プラスチックプレートに 4×10^4 個/ウェルになるように蒔いた。10%CO₂、25%O₂、65%N₂の条件下37℃で培養した。24時間培養後、無血清基礎培地にHGFを0から20ng/mlの範囲で段階的に加えた試験培地に交換し、培養を続けた。24時間培養後、0.5μCiの[¹²⁵I]デオキシウリジンを各ウェルに添加した。さらに4時間培養して細胞に[¹²⁵I]を取り込ませた後、細胞をpH7.4のPBS（リン酸食塩緩衝液）にて洗浄し、冷10%トリクロロ酢酸水溶液で固定した。細胞を1N水酸化ナトリウム水溶液で可溶化し、その放射能をガンマカウンターにより測定した。また放射能測定後の試料の一部をとってMicro BCA Protein Assay System（ピアース社）により蛋白質量を測定した。細胞内に取り込まれた標識デオキシウリジンの量をコントロールとのカウント差として求め、これをヒト正常表皮メラノサイト蛋白質1mgあたりに換算してDNA合成活性（dpm/mg蛋白質）とした。その結果、図2に示す如く正常メラノサイトHGFにより0~10ng/mlの範囲で用量依存的に複製DNA合成を促進され、最適濃度において約4倍にまで高められることが確認された。

[0022] 実施例5

ヒト正常表皮ケラチノサイトの増殖に対する効果

本発明の上皮細胞増殖促進剤の有効成分であるHGFの、ケラチノサイトに対する増殖促進作用を以下の方法により確認した。実施例1に記載された無血清基礎培地にウシ視床下部抽出物150μg蛋白質/mlを加えた培地にヒト正常表皮ケラチノサイトを懸濁し、12穴プラスチックプレートに 10^4 個/ウェルになるように蒔いた。10%CO₂、25%O₂、65%N₂の条件下37℃で培養した。24時間培養後、カルシウムイオン濃度を1.8mMに調整した無血清基礎培地に交換し、更に24時間培養後、HGFを0から20ng/mlの範囲で段階的に添加し、培養を続けた。培養開始6日後、培地をHGFを加えた新しい培地に交換して培養を続け、4日後（培養開始から10日後）培養を終了し、最終細胞数をヘモサイトメーターにてカウントした。その結果、図3に示す如く正常ケラチノサイトはHGFにより0~2.5ng/mlの範囲で用量依存的に増殖を促進され、最適濃度において約3倍にまで高められることが確認された。

[0023] 実施例6

ヒト正常表皮ケラチノサイトの複製DNA合成に対する効果

実施例3に記載された無血清基礎培地にウシ視床下部抽出物150μg蛋白質/mlを加えた培地にヒト正常表皮ケラチノサイトを懸濁し、24穴プラスチックプレートに 4×10^4 個/ウェルになるように蒔いた。10%CO₂、25%O₂、65%N₂の条件下37℃で培養

した。24時間培養後、カルシウムイオン濃度を1.8mMに調整した無血清基礎培地に交換し、さらに24時間培養後HGFを0から20ng/mlの範囲で段階的に添加し、培養を続けた。24時間培養後、0.5μCiの[¹²⁵I]デオキシウリジンを各ウェルに添加した。さらに4時間培養して細胞に[¹²⁵I]を取り込ませた後、細胞をpH7.4のPBS（リン酸食塩緩衝液）にて2回洗浄し、冷10%トリクロロ酢酸水溶液で固定した。細胞を1N水酸化ナトリウム水溶液で可溶化し、その放射能をガンマカウンターにより測定した。また放射能測定後の試料の一部をとってMicro BCA Protein Assay System（ピアース社）により蛋白質量を測定した。細胞内に取り込まれた標識デオキシウリジンの量をコントロールとのカウント差として求め、これをヒト正常表皮メラノサイト蛋白質1mgあたりに換算してDNA合成活性（dpm/mg蛋白質）とした。その結果、図4に示す如く正常メラノサイトHGFにより0~5ng/mlの範囲で用量依存的に複製DNA合成を促進され、最適濃度において約2倍にまで高められることが確認された。

[0024] 実施例7

ヒト正常表皮ケラチノサイトの増殖に対する効果

実施例3に記載された無血清基礎培地にウシ視床下部抽出物150μg蛋白質/mlを加えた培地にヒト正常表皮ケラチノサイトを懸濁し、12穴プラスチックプレートに 2×10^4 個/ウェルになるように蒔いた。10%CO₂、25%O₂、65%N₂の条件下37℃で培養した。2日間培養後、カルシウムイオン濃度を1.8mMに調整した無血清基礎培地に交換し、さらに2日間培養後HGFを2.5ng/ml添加し、培養を続けた。24時間培養後（培養開始から5日後）、細胞の増殖程度を顕微鏡下で観察した。その結果、図5に示す如く、HGF添加培養液で培養した正常ケラチノサイトは無添加の場合に比して明らかに増殖が促進されていた。

[0025] 実施例8

ヒト正常表皮ケラチノサイトの細胞運動性に対する効果

本発明の上皮細胞増殖促進剤の有効成分であるHGFの、ケラチノサイトの細胞運動性に対する促進作用を以下の方法により確認した。実施例3に記載された無血清基礎培地にウシ視床下部抽出物150ng蛋白質/mlを加えた培地にヒト正常表皮ケラチノサイトを懸濁し、12穴プラスチックプレートに 2×10^4 個/ウェルになるように蒔いた。10%CO₂、25%O₂、65%N₂の条件下37℃で培養した。2日間培養後、ウシ視床下部抽出物を添加しない無血清基礎培地に交換し、さらに24時間培養後HGFを0から10ng/mlの範囲で段階的に添加し、培養を続けた。24時間後（培養開始から4日後）培養を終了し、細胞の状態を顕微鏡下で観察した。その結果、図6に示す如く、HGF添加培養液で培養したヒト正常表皮ケラチノサイトは無添加の

ものに比べて細胞同士の接着が弱まり、細胞の運動性が高まっていることが確認された。

【0026】実験例

ヒト正常表皮ケラチノサイトの細胞運動性に対するEGF、TGF- α の効果

本発明の上皮細胞増殖促進剤の有効成分であるHGFと同様に上皮の細胞を増殖するEGF、TGF- α のケラチノサイトの細胞運動性に対する促進作用を、実施例8と同様の方法により確認した。実施例3に記載された無血清基礎培地にウシ視床下部抽出物150 μ g蛋白質/mlを加えた培地にヒト正常表皮ケラチノサイトを懸濁し、12穴プラスチックプレートに2 \times 10⁴個/ウェルになるように蒔いた。10%CO₂、25%O₂、65%N₂の条件下37℃で培養した。2日間培養後、ウシ視床下部抽出物を添加しない無血清基礎培地に交換し、さらに24時間培養後EGFまたはTGF- α を10ng/mlの濃度で添加し、培養を続けた。24時間*

* 後(培養開始から4日後)培養を終了し、細胞の状態を顕微鏡下で観察した。その結果、図7に示す如く、EGF、TGF- α 添加培養液で培養したヒト正常表皮ケラチノサイトは図6のHGF添加培養の場合に比べて細胞同士の接着に変化がなく、細胞の運動性を促進する効果がないことが確認された。

【0027】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：2184

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列

ATG TGG GTG ACC AAA CTC CTG CCA GCC CTG CTG CTG CAG CAT GTC CTC	48
CTG CAT CTC CTC CTG CTC CGC ATC GCC ATC CCC TAT GCA GAG GGA CAA	96
AGG AAA AGA AGA AAT ACA ATT CAT GAA TTC AAA AAA TCA GCA AAG ACT	144
ACC CTA ATC AAA ATA GAT CCA CCA CTG AAG ATA AAA ACC AAA AAA GTG	192
AAT ACT GCA GAC CAA TGT GCT AAT AGA TGT ACT AGG AAT AAA GGA CTT	240
CCA TTC ACT TGC AAG GCT TTT GTT TTT GAT AAA CCA AGA AAA CAA TGC	288
CTC TGG TTC CCC TTC AAT AGC ATG TCA AGT GGA GTG AAA AAA GAA TTT	336
GGC CAT GAA TTT GAC CTC TAT GAA AAG ABA GAC TAC ATT AGA AAC TGC	384
ATC ATT GGT AAA GGA CGC AGC TAC AAG GGA ACA GTA TCT ATC ACT AAG	432
AGT GGC ATC AAA TGT CAG CCC TGG AGT TCC ATG ATA CCA CAC GAA CAC	480
AGC TTT TTG CCT TCG AGC TAT CGG GGT AAA GAC CTA CAG GAA AAC TAC	528
TGT CGA AAT CCT CGA GGG GAA GAA GGG GGA CCC TGG TGT TTC AGA AGC	576
AAT CCA GAG GTA CGC TAC GAA GTC TGT GAC ATT CCT CAG TGT TGA GAA	624
GTT GAA TGC ATG ACC TGC AAT GGG CAG AGT TAT CGA GGT CTC ATG GAT	672
CAT ACA GAA TCA CGC AAG ATT TGT CAG CGC TGG GAT CAT CAG ACA CCA	720
CAG CGG CAG AAA TTC TTG CCT GAA AGA TAT CCC GAC AAG GGC TTT GAT	768
GAT AAT TAT TGC CGC AAT CCC GAT GGC CAG CGC AGG CCA TGG TGC TAT	816
ACT CTT GAC CCT CAC ACC CGC TGG GAG TAC TGT GCA ATT AAA ACA TGC	864
GCT GAC AAT ACT ATG AAT GAC ACT GAT GTT CCT TTG GAA ACA ACT GAA	912
TGC ATC CAA GGT CAA GGA GAA GGC TAC AGG GGC ACT GTC AAT ACC ATT	960

TGG AAT GGA ATT CCA TGT CAG CGT TGG GAT TGT CAG TAT CCT CAC GAG	1008
CAT GAC ATG ACT CCT GAA AAT TTC AAC TGC AAG GAC CTA CGA GAA AAT	1056
TAC TGC CGA AAT CCA GAT GGG TGT GAA TCA CGC TGG TGT TTT ACC ACT	1104
GAT CCA AAC ATC CGA GTT GGC TAC TGC TCC GAA ATT CCA AAC TGT GAT	1152
ATG TCA CAT GGA CAA GAT TGT TAT CGT GGG AAT GGC AAA AAT TAT ATG	1200
GGC AAC TTA TCC CAA ACA AGA TCT GGA CTA ACA TGT TCA ATG TGG GAC	1248
AAG AAC ATG GAA GAC TTA CAT CGT CAT ATC TTC TGG GAA CCA GAT GCA	1296
ACT AAG CTG AAT GAG AAT TAC TGC CGA AAT CCA GAT GAT GAT GGT CAT	1344
GGA CGC TGG TGC TAC ACG GGA AAT CCA CTC ATT CCT TGG GAT TAT TGC	1392
CCT ATT TCT CGT TGT GAA GGT GAT ACG AGA CCT ACA ATA GTC AAT TTA	1440
GAC CAT CGC GTA ATA TCT TGT GCC AAA ACG AAA CAA TTC CGA GTT GTA	1488
AAT GGG AIT CCA ACA CGA ACA AAC ATA CGA TGG ATG GTT AGT TTC AGA	1536
TAC AGA AAT AAA CAT ATC TGC GGA GGA TCA TTC ATA AAC GAG AGT TGC	1584
GTT CTT ACT GCA CGA CAG TGT TTC CCT TCT CGA CAC TTG AAA GAT TAT	1632
GAA GCT TGG CTT GGA ATT CAT GAT GTC CAC GGA AGA GGA GAT GAG AAA	1680
TGC AAA CAG GTT CTC AAT GTT TCC CAG CTG GTA TAT GGC CCT GAA GGA	1728
TCA GAT CTG GTT TTA ATC AAG CTT GCC AGG CCT GCT GTC CTG GAT GAT	1776
TTT GTT AGT ACG ATT GAT TTA CCT AAT TAT GGA TGC ACA ATT CCT GAA	1824
AAG ACC AGT TGC AGT GTT TAT GCC TGG GGC TAC ACT GGA TTG ATC AAC	1872
TAT GAT GGC CTA TTA CGA GTG GCA CAT CTC TAT ATA ATG GGA AAT GAG	1920
AAA TGC AGC CAG CAT CAT CGA GGG AAG GTG ACT CTG AAT GAG TCT GAA	1968
ATA TGT GCT GGG GCT GAA AAG ATT GGA TCA GGA CCA TGT GAG GGG GAT	2016
TAT GGT GGC CGA CTT GTT TGT GAG CAA CAT AAA ATG AGA ATG GTT CTT	2064
GGT GTC ATT GTT CCT GGT CGT GGA TGT GGC ATT CGA AAT CGT CCT GGT	2112
ATT TTT GTC CGA GTA GCA TAT TAT GCA AAA TGG ATA CAC AAA ATT ATT	2160
TTA ACA TAT AAG GTA CCA CAG TCA	2184

〔0028〕配列番号：2

配列の長さ：728

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：蛋白質

配列

Met Trp Val Thr Lys Leu Leu Pro Ala Leu Leu Leu Gln His Val Leu
5 10 15
Leu His Leu Leu Leu Leu Pro Ile Ala Ile Pro Tyr Ala Glu Gly Gln
20 25 30
Arg Lys Arg Arg Asn Thr Ile His Glu Phe Lys Lys Ser Ala Lys Thr
35 40 45
Thr Leu Ile Lys Ile Asp Pro Ala Leu Lys Ile Lys Thr Lys Lys Val
50 55 60
Asn Thr Ala Asp Gln Cys Ala Asn Arg Cys Thr Arg Asn Lys Gly Leu
65 70 75 80
Pro Phe Thr Cys Lys Ala Phe Val Phe Asp Lys Ala Arg Lys Gln Cys
85 90 95
Leu Trp Phe Pro Phe Asn Ser Met Ser Ser Gly Val Lys Lys Glu Phe
100 105 110
Gly His Glu Phe Asp Leu Tyr Glu Asn Lys Asp Tyr Ile Arg Asn Cys
115 120 125
Ile Ile Gly Lys Gly Arg Ser Tyr Lys Gly Thr Val Ser Ile Thr Lys
130 135 140
Ser Gly Ile Lys Cys Gln Pro Trp Ser Ser Met Ile Pro His Glu His
145 150 155 160
Ser Phe Leu Pro Ser Ser Tyr Arg Gly Lys Asp Leu Gln Glu Asn Tyr
165 170 175
Cys Arg Asn Pro Arg Gly Glu Glu Gly Gly Pro Trp Cys Phe Thr Ser
180 185 190
Asn Pro Glu Val Arg Tyr Glu Val Cys Asp Ile Pro Gln Cys Ser Glu

195	200	205	
Val Glu Cys Met Thr Cys Asn Gly Glu Ser Tyr Arg Gly Leu Met Asp			
210	215	220	
His Thr Glu Ser Gly Lys Ile Cys Gln Arg Trp Asp His Gln Thr Pro			
225	230	235	240
His Arg His Lys Phe Leu Pro Glu Arg Tyr Pro Asp Lys Gly Phe Asp			
245	250	255	
Asp Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Gln Pro Arg Pro Trp Cys Tyr			
260	265	270	
Thr Leu Asp Pro His Thr Arg Trp Glu Tyr Cys Ala Ile Lys Thr Cys			
275	280	285	
Ala Asp Asn Thr Met Asn Asp Thr Asp Val Pro Leu Glu Thr Thr Glu			
290	295	300	
Cys Ile Gln Gly Gln Gly Glu Gly Tyr Arg Gly Thr Val Asn Thr Ile			
305	310	315	320
Trp Asn Gly Ile Pro Cys Gln Arg Trp Asp Ser Gln Tyr Pro His Glu			
325	330	335	
His Asp Met Thr Pro Glu Asn Phe Lys Cys Lys Asp Leu Arg Glu Asn			
340	345	350	
Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Ser Glu Ser Pro Trp Cys Phe Thr Thr			
355	360	365	
Asp Pro Asn Ile Arg Val Gly Tyr Cys Ser Gln Ile Pro Asn Cys Asp			
370	375	380	
Met Ser His Gly Gln Asp Cys Tyr Arg Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Met			
385	390	395	400
Gly Asn Leu Ser Gln Thr Arg Ser Gly Leu Thr Cys Ser Met Trp Asp			
405	410	415	
Lys Asn Met Glu Asp Leu His Arg His Ile Phe Trp Glu Pro Asp Ala			
420	425	430	

Ser Lys Leu Asn Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asp Asp Ala His
435 440 445
Gly Pro Trp Cys Tyr Thr Gly Asn Pro Leu Ile Pro Trp Asp Tyr Cys
450 455 460
Pro Ile Ser Arg Cys Glu Gly Asp Thr Thr Pro Thr Ile Val Asn Leu
465 470 475 480
Asp His Pro Val Ile Ser Cys Ala Lys Thr Lys Gln Leu Arg Val Val
485 490 495
Asn Gly Ile Pro Thr Arg Thr Asn Ile Gly Trp Met Val Ser Leu Arg
500 505 510
Tyr Arg Asn Lys His Ile Cys Gly Gly Ser Leu Ile Lys Glu Ser Trp
515 520 525
Val Leu Thr Ala Arg Gln Cys Phe Pro Ser Arg Asp Leu Lys Asp Tyr
530 535 540
Glu Ala Trp Leu Gly Ile His Asp Val His Gly Arg Gly Asp Glu Lys
545 550 555 560
Cys Lys Gln Val Leu Asn Val Ser Gln Leu Val Tyr Gly Pro Glu Gly
565 570 575
Ser Asp Leu Val Leu Met Lys Leu Ala Arg Pro Ala Val Leu Asp Asp
580 585 590
Phe Val Ser Thr Ile Asp Leu Pro Asn Tyr Gly Cys Thr Ile Pro Glu
595 600 605
Lys Thr Ser Cys Ser Val Tyr Gly Trp Gly Tyr Thr Gly Leu Ile Asn
610 615 620
Tyr Asp Gly Leu Leu Arg Val Ala His Leu Tyr Ile Met Gly Asn Glu
625 630 635 640
Lys Cys Ser Gln His His Arg Gly Lys Val Thr Leu Asn Glu Ser Glu
645 650 655
Ile Cys Ala Gly Ala Glu Lys Ile Gly Ser Gly Pro Cys Glu Gly Asp

660 665 670
 Tyr Gly Gly Pro Leu Val Cys Glu Gln His Lys Met Arg Met Val Leu
 675 680 685
 Gly Val Ile Val Pro Gly Arg Gly Cys Ala Ile Pro Asn Arg Pro Gly
 690 695 700
 Ile Phe Val Arg Val Ala Tyr Tyr Ala Lys Trp Ile His Lys Ile Ile
 705 710 715 720
 Leu Thr Tyr Lys Val Pro Gln Ser
 725

【図面の簡単な説明】

【図1】ヒト正常表皮メラノサイトの増殖に対するHGFの促進効果を示す図。●は各HGF濃度における培養終了時の細胞数（実施例3）。

【図2】ヒト正常表皮メラノサイトの増殖に対するHGFの促進効果を示す図。●は各HGF濃度における培養終了時の蛋白質量あたりのDNA合成量（実施例4）。

【図3】ヒト正常表皮ケラチノサイトの増殖に対するHGFの促進効果を示す図。●は各HGF濃度における培養終了時の細胞数（実施例5）。

【図4】ヒト正常表皮ケラチノサイトの増殖に対するHGFの促進効果を示す図。●は各HGF濃度における培養終了時の蛋白質量あたりのDNA合成量（実施例

6）。

【図5】ヒト正常表皮ケラチノサイトの増殖に対するHGFの促進効果を示す顕微鏡観察写真。（a）はHGF無添加培養、（b）はHGF 2.5 ng/ml 添加培養（実施例7）。

【図6】ヒト正常表皮ケラチノサイトの運動性に対するHGFの促進効果を示す顕微鏡観察写真。（a）はHGF無添加培養、（b）はHGF 1 ng/ml 添加培養、（c）はHGF 10 ng/ml 添加培養（実施例8）。

【図7】ヒト正常表皮ケラチノサイトの運動性に対するEGF、TGF- α の促進効果を示す顕微鏡観察写真。（a）はEGF、（b）はTGF- α をそれぞれ10 ng/ml 添加培養したもの（実験例）。

THIS PAGE BLANK (USPTO)